

Die Bedeutung des Corticotropin-Releasing-Faktors im cerebellären

Cortex während der postnatalen Entwicklung der Ratte

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität

von Heidi Sharafbayani (geb. Bornmann)

geboren am: 04.01.1977 in: Jena

Gutachter

1. _____

2. _____

3. _____

Tag der öffentlichen Verteidigung: _____

Abkürzungen

Abb.	Abbildung(en)
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACTH	Adrenocorticotropin Hormon
AK	Antikörper
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CRF	Corticotropin-Releasing-Faktor
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CWSF	Cold-Waterfish Skin Gelantine
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
EGL	Extra Granular Layer, Äußere Körnerzellschicht
EM	Elektronenmikroskop(ie)
GA	Glutaraldehyd
GSSP	Gold substituiert Silber Peroxidase
IM	Inkubationsmedium
KF	Kletterfaser(n)
LM	Lichtmikroskop(ie)
LTD	Long-Term-Depression
LTP	Long-Term-Potenzierung
MF	Moosfaser(n)
Na-cac.	Natriumcacodylatpuffer
Ncl./Ncll.	Nucleus, Nuclei
NGS	Normal Goat Serum
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphatsalzpuffer
PB	Phosphate buffer, Phosphatpuffer
PD	Postnatal day, postnataler Tag
PF	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Phosphatpuffer
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PZ	Purkinjezelle(n)

RT	Raumtemperatur
Str. ga/PL	Stratum ganglionare, Purkinjecell Layer, Purkinjezellschicht
Str. gr/GL	Stratum granulosum, Granulecell Layer, Körnerzellschicht
Str. m/ML	Stratum molekulare, Molecularcell Layer, Molekularschicht
TBS	Tris-buffered saline, Trispuffer
VDR	Vitamin-D3 Rezeptor
WM	White Matter, weiße Substanz

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die Anatomie des Cerebellums	2
2.2	Input und Output im Cerebellum	3
2.3	Der cerebelläre Cortex	5
2.4	Entwicklung des Cerebellums	8
2.5	Der Corticotropin-Releasing-Faktor	11
3	Zielsetzung	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Tierhaltung	14
4.2	Methoden	14
4.2.1	Materialentnahme	14
4.2.1.1	Fixationen für Materialentnahme	15
4.2.1.1.1	Protokoll A	15
4.2.2	Lichtmikroskopische Verfahren	15
4.2.2.1	Preembedding Methode für Lichtmikroskopie	16
4.2.2.1.1	Protokoll B	16
4.2.2.1.2	Rezepte	17
4.2.3	Kontrollen der Lichtmikroskopie	18
4.2.4	Elektronenmikroskopische Verfahren	18
4.2.4.1	Preembedding Technik für Elektronenmikroskopie	19
4.2.4.1.1	Protokoll C	19
4.2.5	Kontrollen der Elektronenmikroskopie	21
4.3	Chemikalien	21

5	Ergebnisse	24
5.1	Methodische Aspekte	24
5.1.1	Optimierung der Preembedding Technik für postnatale Cerebelli	24
5.1.2	Vergleich der Osmium mit der Phend Methode	24
5.2	Lichtmikroskopische Lokalisation von CRF	25
5.2.1	Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Ergebnisse	40
5.3	Elektronenmikroskopische Lokalisation von CRF	42
5.3.1	Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse	47
6	Diskussion	50
6.1	Immunhistochemische Lokalisation von CRF	50
6.1.1	Der cerebelläre Cortex	51
6.1.2	Das afferente und efferente System	54
6.2	CRF während der Entwicklung	55
6.3	Die CRF-Rezeptoren	57
6.4	Methodische Aspekte	59
6.5	CRF als neuroaktives Peptid	60
7	Schlussfolgerungen	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Anhang	76
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	

Des Menschen Herz erdenkt sich seinen Weg;
aber der Herr allein lenkt seinen Schritt.

Bibelauszug: Sprüche 16, 9

Für meine Familie und vor allem meinen Ehemann Burhan!

Ich liebe Euch!

Das Neuropeptid CRF, Corticotropin-Releasing-Faktor, findet sich nicht nur im Hypothalamus-Hypophysen System als Respons zu Stress. CRF spielt wahrscheinlich ebenfalls bei der synaptischen Plastizität in Form von LTD, Long-Term-Depression, im Cerebellum eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit ist die Lokalisation von CRF im Cerebellum während der postnatalen Entwicklung der Wistar-Ratten durch immunhistochemische Verfahren licht- und elektronenmikroskopisch untersucht worden.

Kletter- und Moosfasern weisen lichtmikroskopisch am 3. postnatalen Tag (PD 3) eine geringe CRF-Aktivität in der Körnerzellschicht auf. Die immunhistochemisch gefärbten Zellen nehmen bis PD 9 an Größe und Anzahl zu. Eine deutliche Darstellung von CRF-positiven Elementen findet sich bei PD 12. Hier werden auch Neurone in der Purkinjezell- sowie in der Molekularschicht immunhistochemisch dargestellt.

Die entwicklungsspezifischen Veränderungen von CRF im cerebellären Cortex können auf eine Funktion als Neuromodulator hinweisen. Möglicherweise stimuliert das Neuropeptid die Ausreifung von synaptischen Kontakten der Kletter- und Moosfasern.

Der Dendritenbaum einer Purkinjezelle erlangt nach circa drei Wochen seine endgültige Größe. Innerhalb dieser Periode erreicht die Entwicklung der synaptischen Kontakte ihren Höhepunkt. Das Neuropeptid CRF spielt hierbei vielleicht eine sehr entscheidende Rolle.

Des weiteren ist entscheidend, dass CRF in säulenförmigen Abschnitten im postnatalen Cerebellum anzutreffen ist, was einen weiteren Hinweis für die spezifische Lokalisation des Neurotransmitters darstellt.

Die Befunde aus lichtmikroskopischen Versuchen konnten durch elektronenmikroskopische Experimente bestätigt werden, in welchem eine weitere Zellreihe mit CRF-positiven Reaktionsprodukten im Zytoplasma identifiziert werden konnte, die Bergmann-Glia. Diese Gliazellen sind bedeutend bei der postnatalen Migration von Körner- und Purkinjezellen.

2 Einleitung

2.1 Die Anatomie des Cerebellums

Das Cerebellum der Säugetiere ist ein hoch entwickeltes Organ und umfasst eine Reihe von spezifischen Zellgruppen, welche in einer strikten Anordnung anzutreffen sind. In der cerebralen Entwicklung wird das Cerebellum relativ früh angelegt (Trepel 1995). Dieser Entwicklungsprozess ist postnatal nicht vollständig abgeschlossen.

Beim Menschen ist die Histogenese des Cerebellums noch Monate nach der Geburt aktiv. Besonders die Differenzierung des cerebellären Cortex sowie Myelinisierung und Synaptogenese finden erst postnatal ihren Abschluss (Altman und Bayer 1997; Wang und Zoghbi 2001).



Abb. 2.1-1

Dorsalansicht des Cerebrums einer adulten Wistar-Ratte fixiert mit Pikrinesäure

- 1 Telencephalon
- 2 Hemisphären (Cerebellum)
- 3 Vermis (Cerebellum)
- 4 Medulla oblongata

Das Cerebellum umschließt von beiden Seiten die Medulla oblongata und den Pons (Abb. 2.1-1). Seine Afferenzen und Efferenzen verlaufen in den drei Kleinhirnstielen: Pedunculus cerebelli superior, medius und inferior. Über diese Strukturen ist es mit dem Hirnstamm verbunden.

Gegliedert wird das Cerebellum in einen unpaaren Kleinhirnwurm, Vermis cerebelli, und in die beiden Hemisphären. Kaudal des Vermis befindet sich das Vestibulocerebellum: Flocculus und Nodus. Der Flocculus ist über eine stielartige Struktur nach medial mit dem Nodus verbunden, den Lobus flocculonodularis.

2.2 Input und Output im Cerebellum

Phylogenetisch kann das Cerebellum in drei Abschnitte gegliedert werden. Dies hat sowohl funktionelle als auch klinische Bedeutung. Der Lobus flocculonodularis ist der stammesgeschichtlich älteste Teil und wird Vestibulocerebellum genannt. Seine vestibulären Erregungen erhält er über direkte und indirekte sensorische Kleinhirnbahnen der Vestibulariskerne im Hirnstamm.

Das Spinocerebellum besteht aus dem Vermis und der paravermalen (intermediären) Zone. Propriozeptive Kollateralen empfängt das Vestibulocerebellum über den Tractus spinocerebellaris aus dem Bewegungsapparat sowie kortikale und extrapyramidale Impulse.

Die Hemisphären, der phylogenetisch jüngste Teil, umfasst das Pontocerebellum. Dieses erhält seine Informationen aus der Großhirnrinde, über die Oliven sowie von den Brückenkernen.

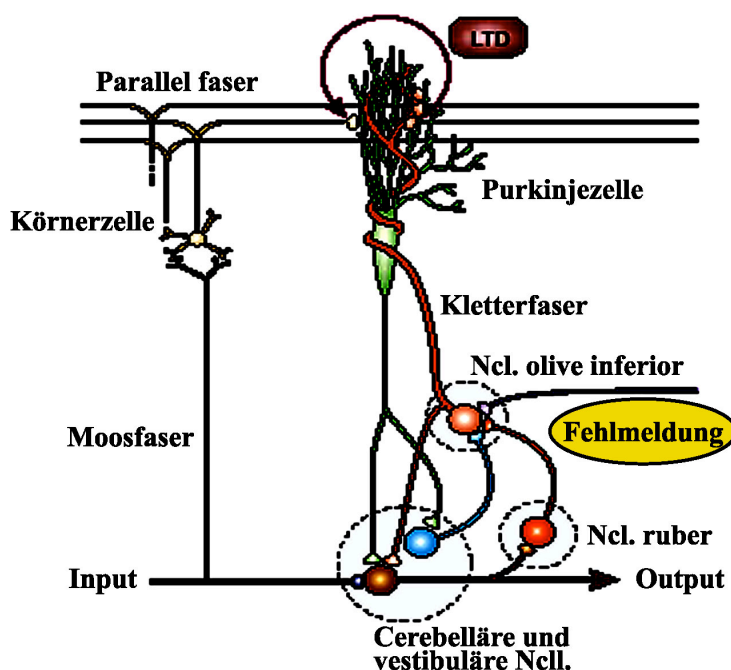


Abb. 2.2-1
Schematische Darstellung des neuronalen cerebellären Kreislaufs für Long-Term-Depression (LTD) mit verschiedenen Kerngebieten (Ncl./Ncll.: Kern/e)
(Ito 2002)

Die Abb. 2.2-1 (Ito 2002) zeigt schematisch den neuronalen Kreislauf für LTD innerhalb des Cerebellums. Hierbei wird verdeutlicht, dass die Afferenzen des Cerebellums vorwiegend aus cerebellären und vestibulären Kernen, sowie dem Ncl. ruber und der unteren Olive stammen. Die Ncll. vestibulares, die Oliven und die Formatio reticularis erhalten überwiegend ihre Informationen aus Anteilen des Hirnstammes. Außerdem erreichen den cerebellären Cortex Erregungen aus den Brückenkernen, dem Rückenmark und dem Hirnstamm. Die verarbeiteten Erregungen gelangen danach über das Purkinjezellaxon in die Kleinhirnerne (Abb. 2.2-1). Diese können als Output den cerebellären Kreislauf verlassen oder erneut den Ncl. ruber erreichen.

Informationen der Lokomotion erhält das Vestibulocerebellum über Bahnen aus den Vestibulariskernen. Seine Efferenzen projizieren zurück in die Vestibulariskerne sowie in die Formatio reticularis.

Damit nimmt das Cerebellum einen entscheidenden Einfluss auf die Stützmotorik des Rumpfes. Als afferente Fasern erreichen das Spinocerebellum Projektionen aus dem Rückenmark. Über diesen Mechanismus erhält es ständig Informationen über die Stellung der Extremitäten, des Rumpfes und den Tonus der Muskulatur. Nach umfassender Verarbeitung werden diese Impulse als Efferenzen vom Cerebellum zum Ncl. ruber und zur Formatio reticularis geleitet. Danach werden sie in das Rückenmark projiziert. Auf diese Weise beeinflussen die Impulse den Muskeltonus und die Bewegung der Extremitäten, wobei insbesondere die proximale Muskulatur kontrolliert wird (Trepel 1995).

Der phylogenetisch jüngste Teil, das Pontocerebellum, erfüllt die Funktionen für Feinabstimmung und Koordination von willkürlichen Zielbewegungen. Diese werden vom Assoziationskortex aus entworfen, gelangen in den Motorkortex und über die Pyramidenbahnen zum Rückenmark. Für die indirekte Rückmeldung eigener Impulse empfängt das Pontocerebellum Afferenzen aus dem Pons, dem Tractus Frontopontinus, Tractus Temporopontinus sowie aus den Oliven.

Die entsendeten Informationen werden in einem Regelkreis dem Cerebellum wieder zugeführt, sodass Afferenzen und Efferenzen ständig kontrolliert und neu bearbeitet werden können.

Der Cortex des Cerebellums (Abb. 2.3-1) gliedert sich in eine oberflächlich gelegene Molekularschicht (Stratum molekulare), eine Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare) und eine an die weiße Substanz grenzende Körnerzellschicht (Stratum granulosum). Die exzitatorischen Afferenzen, mit ihren Transmittern Glutamat und Aspartat, erreichen das Cerebellum über zwei Fasersysteme, die Kletterfaser sowie die Moosfaser.

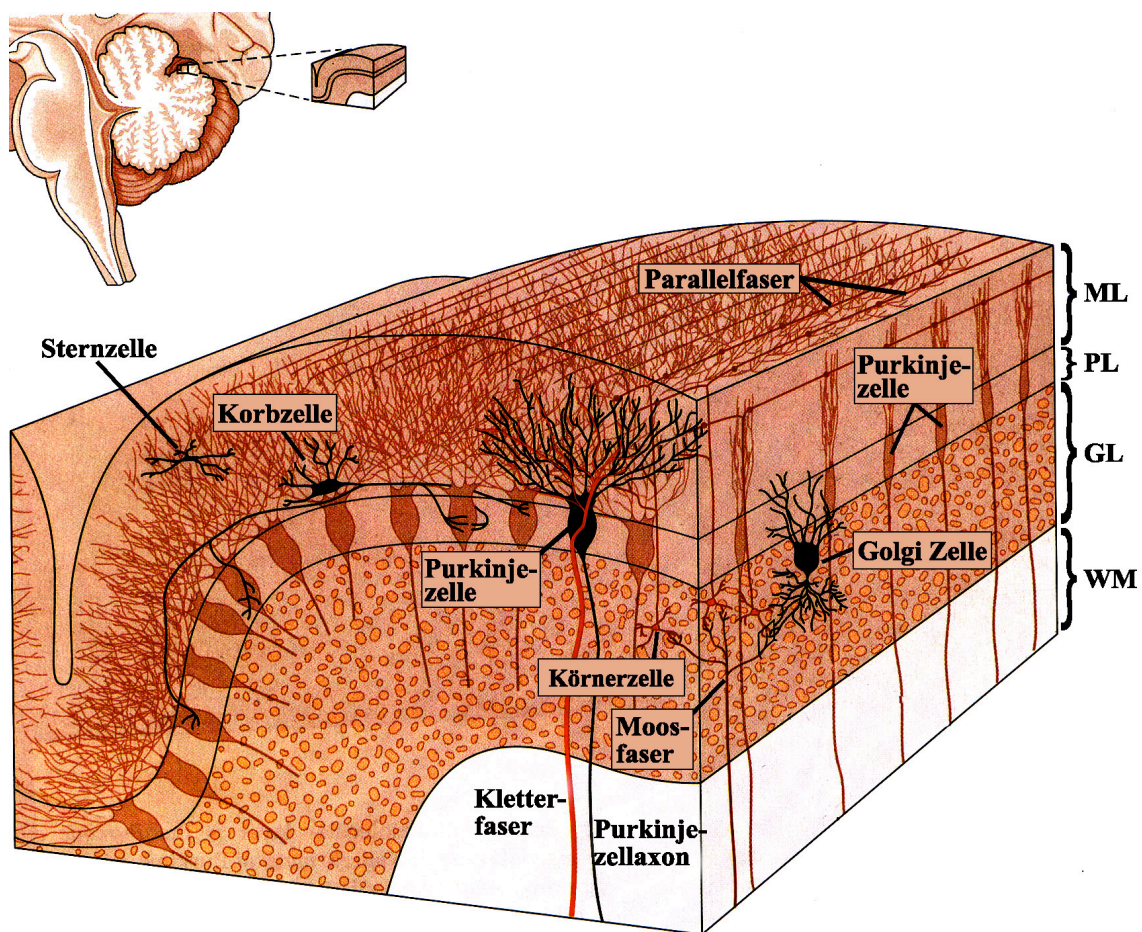


Abb. 2.3-1

Ein Überblick des cerebellären Cortex mit seinem Schichtenaufbau und verschiedenen Zelltypen. Die sagitale und transversale Schnittführung illustriert die Organisation des Cortex.

ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht, MW: Weiße Substanz (Kandel et al. 2000)

Ein Teil der Afferenzen (Abb. 2.2-1 und 2.3-1) gelangt über Moosfasern in den cerebellären Cortex. Diese bilden synaptische Kontakte mit Körnerzellen im Stratum granulosum. Die dabei entstehenden Varikositäten werden als Moosfaserrosetten bezeichnet. Die Ausläufer der Körnerzellen erreichen die Molekularschicht als Parallelfasern, welche mit distal gelegenen Anteilen der Purkinjezeldendriten Verbindungen eingehen. Diese Kontakte werden über sogenannte Spines, dendritische Ausläufer der Purkinjezelle, vermittelt. Die Spines, welche mit Parallelfasern Kontakte knüpfen, sind relativ lang gestreckt (Abb. 2.4-2).

Die Kletterfasern (Abb. 2.2-1 und 2.3-1), als zweite Afferenz, ziehen durch die Körner- und Purkinjezellschicht nach apikal, wobei sie ebenfalls das Stratum molekulare erreichen und an mehreren proximalen Anteilen eines Dendriten über relativ kurze Spines inserieren (Abb. 2.4-2). Jede Purkinjezelle erhält ihre afferenten Zuflüsse aus einer Kletterfaser (Abb. 2.3-1).

Die einzige Efferenz des cerebellären Cortex stellen die Axone der Purkinjezellen dar (Abb. 2.3-1). Sie projizieren zu den Kleinhirnkernen und inhibieren diese durch ihren Transmitter GABA. Damit die Erregung einer Purkinjezelle ihren Zielort erreicht, müssen über Kollateralen benachbarte Zellen gehemmt werden. Dies wird beispielsweise über Verbindungen der Moosfasern zu den Golgizellen (Abb. 2.3-1) gewährleistet, welche die Körnerzellen über einen negativen Feedback hemmen. Zusätzlich erreichen sowohl die Purkinjezellen als auch Korb- und Sternzellen (Abb. 2.3-1) Afferenzen der Parallelfasern. Korb- und Sternzellen inhibieren die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft des Purkinjezellterritoriums. Deshalb werden diese Zellen auch als intrakortikale Hemmneurone bezeichnet (Trepel 1995).

Eine weitere wichtige Zellgruppe sind die Gliazellen. Sie erfüllen eine Reihe lebenswichtiger Funktionen der Nervenzellen, wie z.B. Stütz-, Ernährungs- und Isolierungsfunktionen. Während es Glia- und Körnerzellen möglich ist sich kontinuierlich zu teilen, haben die Nervenzellen diese Eigenschaft fast vollständig verloren.

Die Bergmann-Gliazellen sind im cerebellären Cortex sehr frühzeitig nachweisbare Astrozyten (Zhang und Goldmann 1996). Mit großer Wahrscheinlichkeit bilden sie den Ursprung der Gliazellreihe (Yuasa 1996).

Da sie korbähnlich die Purkinjezellen umfassen (Muller und Kettenmann 1995), bilden sie ein funktionelles Gerüst im Cortex (Hartmann et al. 1998 und Yamada et al. 2000).

Mit ihren Ausläufern zieht die Bergmann-Glia von der Molekularschicht bis in die Körnerzellschicht (Yamada et al. 2000). Dabei wird dieser Abschnitt im cerebellären Cortex als Territorium bezeichnet (Reichenbach et al. 1995). Bergmanngliafortsätze können kontrahieren und somit direkte Appositionen von Axonen und Dendriten ermöglichen. Dieser Vorgang ist für die Synaptogenese entscheidend (Muller und Kettenmann 1995). Auf diese Weise können autonome Interaktionen durchgeführt werden (Grosche et al. 1999).

Neben physiologischen Vorgängen, wie LTD und LTP (Long-Term-Potenzierung), ist die Apposition von synaptischen Kontakten für cerebelläre Lernvorgänge essentiell (Daniel et al. 1998).

Das aktive Lernen wird durch eine Optimierung physiologischer und synaptischer Vorgänge ermöglicht. Die Bergmann-Gliazellen sind bei diesen Prozessen von großer Bedeutung, wie Versuche mit Weaver-Mutanten zeigen. Ohne die Bergmann-Gliazellen ist die cerebelläre synaptische Entwicklung gestört (Muller und Kettenmann 1995).

Erkrankungen des Cerebellums, wie beispielsweise die pontocerebelläre Hypoplasie (Barth 1993), die olivopontocerebelläre Atrophie (Pratap-Chand et al. 1995) und die cerebelläre Ataxie (Bertini und Campos-Castello 1999) stehen im Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschung. Offenbar sind bei diesen Erkrankungen die Mechanismen der cerebellären Entwicklungsprozesse unvollständig oder rückläufig. Zahlreiche Faktoren und Signalkaskaden, welche umfangreiche Verarbeitungsprozesse im Cerebellum ermöglichen, sind bis heute nicht vollständig erforscht.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit könnten auf mögliche Ursachen und Mechanismen für Lern- und Verhaltensprozesse hinweisen. Dies könnte möglicherweise die Entstehung und die Mechanismen von cerebellären Erkrankungen verdeutlichen.

Das Cerebellum entwickelt sich aus Anteilen des Metencephalon (Altman und Bayer 1997). Dieses gliedert sich in eine Ventrikulär-, Intermediär- und Marginalzone. Durch die Proliferation der Ventrikulärzone entstehen eine äußere (Abb. 5.2-1 und 5.2-3) und eine innere Keimschicht, welche postnatal bei der Wistar-Ratte zu identifizieren sind. Aus der äußeren Keimschicht gehen Körner-, Stern-, Korbzellen sowie die Bergmann-Gliazellen hervor (Hartmann et al. 1998). Eine weitere Theorie beschreibt, dass sich die Bergmann-Gliazellen von den Körnerzellen ableiten (Zhang und Goldmann 1996).

Purkinjezellen, Kleinhirnerne und Golgizellen entstehen aus der inneren Keimschicht. Etwa 12 Tage nach der Geburt einer Wistar-Ratte (Abb. 5.2-7) ist die äußere Keimschicht lichtmikroskopisch nicht mehr zu erkennen.

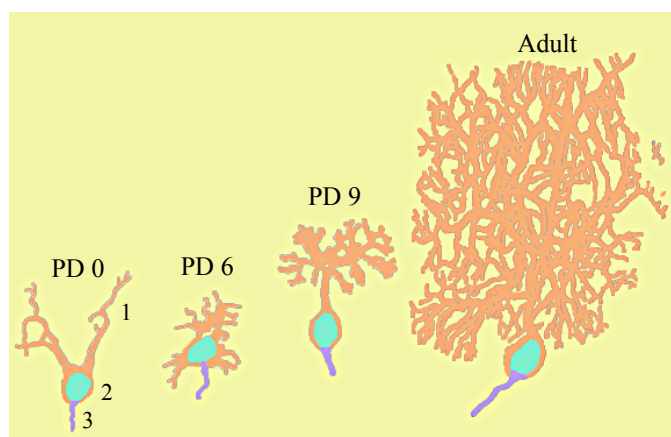


Abb. 2.4-1

Entwicklung einer Purkinjezelle

Dendritenbaum – orange (1)

Zellsoma – blau (2)

Axon – lila (3)

PD: postnataler Tag

Mit der Geburt (PD 0) einer Wistar-Ratte sind im cerebellären Cortex bestimmte Zellschichten bereits ausgebildet (Abb. 2.4-1). Lichtmikroskopisch (Abb. 5.2-1) erscheinen die Purkinjezellen ungeordnet zu proliferieren. Das typische cerebelläre Ordnungsprinzip (Abb. 2.3-1) ist noch nicht zu erkennen. Die Purkinjezellen sind in einer mehrzelligen Schicht bereits als Anlage vorhanden (Abb. 5.2-1) und werden sich innerhalb von Wochen zu einer einzelligen Schicht differenzieren.

Das Zellsoma (2), Teile des Dendritenbaumes (1) und des Axons (3) sind zur Geburt (Abb. 2.4-1) bereits ausgebildet. Der entscheidende Entwicklungsprozess beginnt jedoch postnatal. Dabei richten sich zu Beginn (PD 6) mehrere Dendriten aus. Wenige Tage später (PD 9) entwickelt sich ein Hauptdendrit, der an Größe weiterhin zunimmt und bei der adulten Ratte weit verzweigt in die Molekularschicht verläuft.

Der Dendritenbaum der Purkinjezelle richtet sich bis zum Ende der cerebellären Entwicklungsphase einer Wistar-Ratte (PD 21) dreidimensional in der Molekularschicht aus. In diesem Entwicklungsstadium sind Proliferation und Apoptose im histologischen Präparat indirekt nachzuweisen. An den Dendriten der Purkinjezellen bilden sich Spines aus, dornenartige Fortsätze, welche elektronenmikroskopisch keine Neurotubuli oder Neurofilamente aufweisen. Die Spines führen zu einer vermehrten Oberflächenvergrößerung des rezeptiven Bereiches. Über diese synaptischen Kontakte werden den Purkinjezellen Informationen zugeleitet, wobei diese Elemente dynamisch reagieren können. Ihre Aus- und Rückbildung steht in einem engen Zusammenhang mit der synaptischen Erregung.

Die Parallelfasern (Abb. 2.4-2) setzen an lang ausgestreckten Spines an, die Moosfasern an kürzeren. Die Größe der Spines ist elektronenmikroskopisch ein wichtiges Differenzierungsmerkmal.

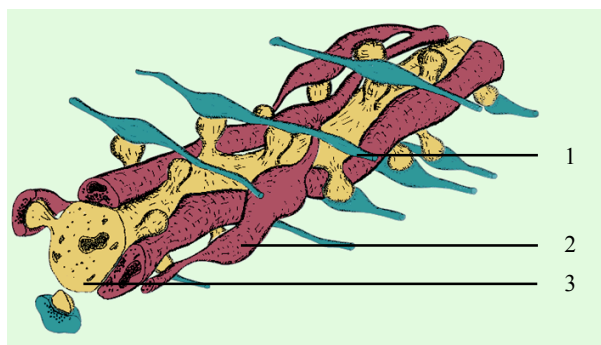


Abb. 2.4-2

Synaptische Kontakte des Purkinjezellendendriten

1 Parallelfaser

2 Kletterfaser

3 Purkinjezellendendrit

Dr J.J.L. van der Want

Bis zur vollständigen Ausreifung sind Proliferation und Degeneration von Purkinjezellen und anderen Zellgruppen massgeblich bei der Differenzierung des cerebellären Cortex beteiligt.

Die genetische Anlage für afferente Fasersysteme und Schaltneurone im Cerebellum ist bei der Geburt vorhanden, ihre weitere Differenzierung wird jedoch erst durch funktionelle Beanspruchung stimuliert oder beendet.

Bei den cerebellären Entwicklungsprozessen spielen LTP und LTD eine entscheidende Rolle. Durch sie werden synaptische Verbindungen gebahnt (LTP) oder unterbrochen (LTD). Diese physiologischen Vorgänge bestimmen zu einem großen Anteil die Verarbeitung von Informationen im zentralen Nervensystem. Auch die cerebelläre Plastizität, ein dynamischer Prozess bei der Knüpfung von synaptischen Kontakten, wird ebenfalls durch physiologische Vorgänge beeinflusst.

Entwicklungsgeschichtlich sind neuronale Wanderungsvorgänge im cerebellären Cortex häufig. Eine wichtige Leitstruktur stellt dabei die Bergmann-Glia dar. Durch ihre Ausläufer wird es beispielsweise der Körnerzelle ermöglicht, den Weg aus der äußeren Keimschicht in die Körnerzellschicht zu finden (Komuro und Rakic 1998).

Außerdem spielt die Bergmann-Gliazelle eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Purkinjezellen (Yamada et al. 2000). Belegt wird dies durch Untersuchungen an Weaver-Mutanten. Durch genetische Manipulation kommt es zu einer frühzeitigen Degeneration der Bergmann-Gliazellen (Smith und Mullen 1997). Dies hat zur Folge, dass die Körnerzellen nicht in das Stratum granulosum wandern sondern degenerieren (Harrison und Roffler-Tarlov 1998).

Die Migration der Purkinjezellen und die Entwicklung der Kleinhirnerne wird durch die Degeneration der Bergmann-Gliazellen gestört (Maricich et al. 1997). Somit können synaptische Interaktionen dieser Zellreihen nicht stattfinden. Die cerebelläre Plastizität ist gestört.

Durch phylogenetische Prozesse und genetische Disposition reifen die cerebellären Strukturen heran. In der zweiten Lebenswoche erhält das Vestibulocerebellum einer Wistar-Ratte einen erheblichen Wachstumsschub. Die Augen der Ratte öffnen sich und eine Fülle von Informationen muss verarbeitet werden. Die Motorik reift in der dritten Woche aus (Gramsbergen 2001). Hierbei sind erhebliche morphologische Veränderungen im Spino- und Pontocerebellum zu beobachten. Erstaunlich sind in dieser Entwicklungsperiode die schnellen Lernvorgänge bei Wistar-Ratten.

Im zeitlichen Rahmen von einigen Wochen eignen sich die Tiere ausgezeichnet für morphologische und physiologische Untersuchungen. Die neuronale Entwicklung im Cerebellum der Wistar-Ratte ist mit dem 21sten postnatalen Tag fast vollständig abgeschlossen (Prof. Dr. Jirikowski: Persönliche Mitteilung, 1999).

Der Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) besteht aus 41 Aminosäuren (Yamano et al. 1994). Bekannt ist, dass das Neuropeptid als hypothalamischer Faktor bei der endokrinen Stressantwort eine bedeutende Rolle einnimmt (Spiess et al. 1981; Vale et al. 1981).

CRF wird in verschiedenen ZNS-Regionen synthetisiert. Besondere Bedeutung hat der Hypothalamus, von wo aus CRF in den adenohipophysären Portalkreislauf sezerniert wird. In Vorderlappenzellen aktiviert CRF eine cAMP-abhängige Proteinkinase A und somit Proopiomelanocortinzellen (POMC-Zellen). Das Hauptprodukt dieser POMC-Zelle ist ACTH, welches unter anderem die Glucocorticoidfreisetzung in der Nebennierenrinde stimuliert (Klinke und Silbernagel 1996).

Die Biosynthese und Freisetzung von CRF in den hypophysären Portalkreislauf stehen unter der Kontrolle von Glucocorticoidhormonen. Über einen negativen Feedback wird die Synthese von CRF durch Cortisol gehemmt. Durch erhöhte CRF-Aktivität werden Glucocorticoide vermehrt ausgeschüttet. Eine besondere Bedeutung für eine erhöhte CRF-Aktivität hat das limbische System. Ihm wird ein großer Einfluss auf zahlreiche ZNS Leistungen, wie Lernen, Gedächtnis und Emotion zugeschrieben.

CRF ist auch im Cerebellum zu finden (King et al. 1996). So wurde CRF in Moos- und Kletterfasern der Ratte lichtmikroskopisch dargestellt (Cummings et al. 1983; Palkovis et al. 1987).

In den letzten Jahren konnten zwei CRF-Rezeptoren, CRF1 und CRF2, identifiziert werden (Perrin et al. 1993; Lovenberg et al. 1995). Mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung wurde die mRNA des CRF1-Rezeptors in Purkinjezellen und Körnerzellen nachgewiesen, für den CRF2-Rezeptor war dies nur sehr begrenzt möglich (Chalmers et al. 1995).

Neue Untersuchungsergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass CRF ein entscheidender Faktor bei der Neuromodulation in der cerebellären Entwicklung ist (Miyata et al. 1999). Nach der Theorie von Miyata und Ito spielt CRF eine wichtige Rolle bei der Induktion von LTD.

In ihren Experimenten konnten Miyato und Ito (1999) zeigen, dass eine spezifische Hemmung von CRF die Auslösung von LTD verhindert. Hierbei wurde einer Proteinkinase C (PKC) eine wichtige Funktion bei diesem Prozess zugeschrieben. Die PKC fungiert in der Zelle als second messenger und löst eine spezifische Reaktion aus. Auch die Experimente von Miyata et al. (1999) weisen auf eine Beteiligung einer PKC bei der Bildung von CRF hin.

Mit der aktiven Hemmung von LTD können Lernprozesse nicht in vollem Ausmaß durchgeführt werden. Bei der Ausbildung von synaptischen Verbindungen sind LTP und LTD von essentieller Bedeutung (Daniel et al. 1998). Durch diese physiologischen Vorgänge können bestimmte Abläufe schneller und effizienter ausgeführt werden. Dies ist beim Erlernen von Bewegungsabläufen unverzichtbar.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe histochemischer Verfahren die Verteilung und Lokalisation von CRF (Corticotropin-Releasing-Faktor) im cerebellären Cortex während der postnatalen Entwicklung der Ratte untersucht. Die Darstellung von CRF in Verbindung mit LTD könnte dabei als Modell für cerebelläre Lernprozesse dienen. Diese Erkenntnisse könnten für das Verständnis von cerebellären Erkrankungen von Bedeutung sein.

Für die Darstellung von CRF mussten die licht- und elektronenmikroskopischen Methoden optimiert werden. Das Ziel war eine Kombination aus gut darstellbarer Morphologie und ausreichend spezifischer Lokalisation. Dabei sollte lichtmikroskopisch die Verteilung von CRF, in verschiedenen Entwicklungsstadien, im cerebellären Cortex untersucht werden. Mit elektronenmikroskopischen Methoden konnte die Lokalisation von CRF spezifisch analysiert werden. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei der Lokalisation des Neuropeptides innerhalb einer Zelle sowie in Synapsen.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass CRF in Kletter- und Moosfasern bei verschiedenen Spezies bereits nachgewiesen wurde. Es wurden Wistar-Ratten mit einem postnatalen Alter von 3, 6, 9, 12, 15, 30 und 40 Tagen für die lichtmikroskopischen Studien verwendet. Für die Elektronenmikroskopie wurden Wistar-Ratten mit einem Alter von 15, 18 und 21 Tagen ausgewählt. Diese postnatalen Stadien beinhalten die wichtigsten Abschnitte der motorischen Entwicklung und der entsprechenden synaptischen Transformation. Die Dynamik und synaptische Plastizität der Purkinjezellen, Kletterfasern, Moosfasern und weiteren Systemen, wie z. B. den dendritischen Spines sind in diesen Stadien gut zu beobachten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse entwicklungsspezifischer Funktionen des Neuropeptides CRF im cerebellären Cortex. Dabei sollte an die bekannten Arbeiten über CRF in Verbindung mit LTD angeknüpft werden und die mögliche Bedeutung als trophischer Faktor im cerebellären Kreislauf untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Tierhaltung

Für die Experimente wurden die Cerebelli von 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 30 und 40 Tage alten Wistar-Ratten beider Geschlechter perfundiert. Die Tierhaltung erfolgte bei Raumtemperatur unter Einhaltung eines 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus. Die Tiere erhielten standardisiertes Trockenfutter sowie Leitungswasser in beliebiger Menge. Alle Eingriffe wurden zwischen 10 und 12 Uhr ausgeführt, um den Einfluss individueller Rhythmen zu vermeiden (Ixart et al. 1993). Die Experimente konnten mit Genehmigung der „Ethischen Kommission für Tierexperimente“ (DEC 1280) an der Reichsuniversität Groningen (RUG) in den Niederlanden durchgeführt werden.

4.2 Methoden

4.2.1 Materialentnahme

Die jungen Wistar-Ratten wurden für licht- und elektronenmikroskopische Zwecke mit 10%iger Pentobarbital-Lösung (ca. 0,1 ml / 100 g Körpergewicht) über Injektion in den Peritonealraum narkotisiert. Danach wurden die Tiere gewogen. Nachdem sie auf dem Operationstisch gut fixiert waren, erfolgte die Perfusion. Dafür wurde der Brust- und Bauchraum eröffnet. Es erfolgte eine Injektion von 0,1 ml Heparin (500 I.E.) in den linken Ventrikel des Herzens, um die Blutgerinnung herabzusetzen. Danach wurde eine Injektionsnadel in den linken Ventrikel eingeführt und der rechte Vorhof eröffnet. Diese Technik ermöglicht die Zirkulation der Perfusionslösung im gesamten Körperkreislauf und den Austritt von Blut aus dem rechten Vorhof.

Zuerst wurde die Spüllösung (Protokoll A), danach die Perfusionslösung (Protokoll A) infundiert. Die Flüssigkeiten zirkulierten bei Raumtemperatur im Körperkreislauf, wobei eine Peristaltikpumpe (Multiperpex Pump 2115, LKB Bromma) auf eine Fließgeschwindigkeit von 8 bis 15 ml/min eingestellt wurde. In das Gefäßsystem wurden ca. 20 ml Spüllösung und ca. 150 ml Perfusionslösung eingebracht. Besondere Beachtung galt dem Perfusionsfluss beim Umschalten der Lösungen. Es wurde darauf geachtet, dass der Perfusionsschlauch luftfrei war, um eine mögliche Luftembolie zu vermeiden. Als letzter Schritt wurde das Cerebellum vorsichtig herauspräpariert und in Spüllösung (Protokoll A) aufbewahrt.

4.2.1.1 Fixationen für Materialentnahme

4.2.1.1.1 Protokoll A

					pH	Osmolarität
						(mOsm/kg)
1. 0,2 M Na-cacodylatpuffer	21,4	g	Na-cac./500 ml H ₂ O		7,4	
2. Spüllösung	6,8	%	Saccharose in 0,1 M Na-cac.	7,4		450
3. Perfusionslösung (A)	2,5	%	Glutaraldehyd			
	1	%	Paraformaldehyd			
	0,1	%	Pikrinesäure			
	in 0,1	M	Na-cac.	7,4		1500
4. Perfusionslösung (B)	1	%	Glutaraldehyd			
	4	%	Paraformaldehyd			
	0,2	%	Pikrinesäure			
	in 0,1	M	Na-cac.	7,4		1700

Die Spül- und Perfusionslösungen wurden frisch vor der Verwendung mit einem Spezialfilter von Mikropore® (Millipore B.V., Bedford, USA) filtriert. Die Porengröße des Filters betrug 0,22 µm.

4.2.2 Lichtmikroskopische Verfahren

Für die Gefrierschnitt-Methode mussten die Cerebelli mindestens 18 h in 30%iger Saccharoselösung bewahrt werden, um die Beschädigungen durch Eiskristalle zu minimieren. Mit Hilfe eines Frigocut 2800® (Reichert-Jung) wurden Kryostatschnitte mit einer Dicke von 20 µm angefertigt. Die Temperatur des Messers war auf –21 °C eingestellt und die Objekte wurden auf –18 °C abgekühlt. Die Schnitte wurden danach in TBS aufbewahrt. Für die immunhistochemischen Verfahren konnten sie mit der Preembedding-Methode (4.2.2.1 und 4.2.4.1) weiter verarbeitet werden. Alle Experimente wurden unter standardisierten Bedingungen bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt.

4.2.2.1 Preembedding Methode für Lichtmikroskopie

4.2.2.1.1 Protokoll B

	Zeit	pH	Temp.
1. Peritoneale Injektion mit 10% Pentobarbital von 0,1 bis 0,2 ml			
2. Organperfusion: Spüllösung	2 min	7,4	RT
Perfusionslösung	5 – 10 min	7,4	RT
Organentnahme			
3. Aufbewahrung in 30% Saccharoselösung in TBS	18 h	7,4	4 °C
4. Anfertigen von Gefrierschnitten in TBS		7,4	-18 °C
5. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
6. Behandlung mit 1% Natriumborohydride in 0,1 M TBS	10 min		RT
7. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
8. Inkubation des 1. Antikörpers: Rabbit-Anti-CRF 1:1000	18 h		RT
9. Spülen mit TBS	4 x 15 min	7,4	4 °C
10. Inkubation des 2. Antikörpers: Goat-Anti-Rabbit Biotin 1:200	2 h		RT
11. Spülen mit TBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
12. Spülen mit PBS	3 x 10 min		4 °C
13. Inkubation des 3. Antikörpers: Avidin-Biotin-Komplex	1 h		RT
14. Spülen mit PBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
15. Spülen mit TBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
16. DAB-Reaktion bei LM Beobachtung	10 min		RT
17. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
18. Auftragung der Schnitte auf Objektträger in Gelatine-Chromalaun-Lösung			
19. Trocknen			
20. Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe und Xylen			
21. Einbettung unter Deckgläschen mit Depexkleber			

4.2.2.1.2 Rezepte

		Zeit	pH
TBS: 100 mM Tris/HCL und 0,9% NaCl			7,4
PBS: 100 mM PB und 0,9% NaCl			7,4
Aufsteigende Alkoholreihe:	30% Ethanol	2 min	
	50% Ethanol	2 min	
	70% Ethanol	2 min	
	96% Ethanol	2 x 2 min	
	100% Ethanol	3 x 2 min	
	Xylol	3 x 2 min	
Inkubationsmedium für 1. AK:	TBS	10 ml	
(IM für 1. AK)	BSA 1%	0,1 g	
	Glyzine 0,1%	0,01 g	
	Lysine 0,1 %	0,01 g	
	CWFS 0,1%	25 µl	
	(Cold Waterfish Skin Gelatine)		
	Triton X-100 1%	50 µl	
	NGS (Normal Goat Serum) 1%	100 µl	
Inkubationsmedium für 2. AK:	TBS	10 ml	
(IM für 2. AK)	BSA 1%	0,1 g	
	Glyzine 0,1%	0,01 g	
	Lysine 0,1 %	0,01 g	
	CWFS 0,1%	25 µl	
	NGS 1%	100 µl	

ABC Reagens: zu 10 ml PBS: 2 Tropfen Reagenz A, mischen
 2 Tropfen Reagenz B, mischen
 30 min stehen lassen und vor Gebrauch mischen

Gelatine-Chromalaun-Lösung: 1 g Gelatine in 50 ml H₂O lösen
 150 ml H₂O auf 95 °C erhitzen und zur Lösung geben
 200 mg Chromalaun zur abgekühlten Lösung geben

4.2.3 Kontrollen der Lichtmikroskopie

Parallel zu Protokoll B wurden Kontrollinkubationen im Inkubationsmedium (IM für 1. AK) ohne Antikörper durchgeführt. Außerdem mussten zu Vergleichszwecken vereinzelte Gefrierschnitte mit Rabbit-Anti-VDR 1:2000 und Rabbit-Anti-CGRP 1:2000 inkubiert werden. Zu Beginn der Experimente wurde eine Vorinkubation in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für zwei Stunden mit einem Inhibitor durchgeführt. Auf diese Vorinkubation wurde in den weiteren Experimenten verzichtet, da keine Notwendigkeit bestand (Dr. Han van der Want: Persönliche Mitteilung, 1999).

4.2.4 Elektronenmikroskopische Verfahren

Für die elektronenmikroskopische Preembedding Methode wurden die Cerebelli bis zu einer Woche in der Perfusionslösung bei 4 °C aufbewahrt. Mit einem Vibratom (Oxford) Series 1000® (Technical Products International, St. Louis) wurde das gekühlte Gewebe in TBS-Puffer (pH 7,4) zu einer Dicke von 80 µm geschnitten und wenn nötig zuvor durch 2% Agaroselösung fixiert. Die notwendige Pufferlösung musste auf 4 °C gekühlt werden, um die enzymatische Aktivität im Untersuchungsmaterial zu verringern. Nach dem Vibratomieren erfolgte sofort die Inkubation der gewonnenen Schnitte.

4.2.4.1 Preembedding Technik für Elektronenmikroskopie

4.2.4.1.1 Protokoll C

	Zeit	pH	Temp.
1. Peritoneale Injektion mit 10% Pentobarbital von ca. 10 ml			
2. Organperfusion: Spüllösung	2 min	7,4	
Perfusionslösung	15 min	7,4	
Organentnahme			
3. Aufbewahrung in TBS			4 °C
4. Anfertigen von Vibratomschnitten			
in TBS mit Eisbad		7,4	1 °C
5. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
6. Behandlung mit 1% Natriumborohydride			
in 0,1 M TBS	10 min		RT
7. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
8. Inkubation des 1. Antikörpers:			
Rabbit-Anti-CRF 1:1000	18 h		RT
9. Spülen mit TBS	4 x 15 min	7,4	4 °C
10. Inkubation des 2. Antikörpers:			
GAR-Biotin 1:200	2 h		RT
11. Spülen mit TBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
12. Spülen mit PBS	3 x 10 min		4 °C
13. Inkubation des 3. Antikörpers	1 h		RT
14. Spülen mit PBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
15. Spülen mit TBS	3 x 10 min	7,4	4 °C
16. DAB-Reaktion bei LM Beobachtung	10 min		RT
17. Spülen mit TBS	3 x 5 min	7,4	4 °C
18. Spülen mit 2% Natriumacetat	3 x 5 min		4 °C
19. Aufbewahrung in Natriumacetat	18 h		4 °C

	Zeit	pH	Temp.
20. GSSP-Prozedur (van den Pol und Gorcs 1986)			RT
Entfärben mit 10% Natriumthioglykolat	4 h		
Spülen mit 2% Natriumacetat	4 x 10 min		
Reaktion	8 min		
Spülen mit 1% Essigsäure	2 min		
Spülen mit 2% Natriumacetat	3 x 5 min		
Inkubation mit 0,05 % Goldchloride	8 min		
Spülen mit 2% Natriumacetat	3 x 5 min		
Fixieren mit 3% Natriumthiosulfat	2 x 10 min		
Spülen mit 2% Natriumacetat	3 x 5 min		
21. Spülen mit 0,1 M Na-cacodylat	4 x 5 min	7,4	4 °C
22. Nachfixierung mit Osmium	15 min		4 °C
1% OsO ₄ und 1,5% K ₄ Fe(CN) ₆ / 0,1 M Na-cac.		7,4	
23. Spülen mit destilliertem H ₂ O	4 x 5 min		4 °C
24. Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe			
25. Epon : Propylenoxid entsprechend 1 : 1	18 h		RT
26. Epon	3 h		RT
27. Eponeinbettung und Polymerisierung	2 d		60 °C

Die Inkubationsmedien und Puffer sind in Protokoll B (4.2.2.1.1) und C (4.2.4.1.1) identisch. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen mussten die CRF-positiven Strukturen mittels GSSP-Prozedur verstärkt werden, um einen ausreichenden Kontrast zu erreichen. Außerdem unterschied sich das Einbettungsverfahren. Im Vergleich wurde mit Osmium (4.2.4.1.1) und mit der Methode nach Phend (Phend et al. 1995) gearbeitet.

Aufsteigende Alkoholreihe:	30% Ethanol	5 min
	50% Ethanol	5 min
	70% Ethanol	5 min
	96% Ethanol	5 min
	100% Ethanol	4 x 10 min
	Propylenoxid	4 x 5 min

Die Vibratomschnitte wurden zwischen Silan beschichteten Objektträgern eingebettet. Nach der Polymerisation ließen sich die Gläser mühelos wieder trennen. Die Schnitte müssen nun lichtmikroskopisch selektiert werden. Dabei wurden die Gebiete mit sichtbar positiver CRF Reaktion mit einem Rasiermesser ausgeschnitten und auf einen Eponblock mittels Zyanocrylatkleber befestigt. Die Blöcke wurden angefräst und danach mit einer Rasierklinge getrimmt. Nun konnte durch das Ultramikrotom Ultratome® (LKB Bromma System 2128) mit Hilfe eines Diamantmesser Diatome® 45° Ultradünnschnitte von 60 nm angefertigt werden. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfergeflechte (Kupfergrids) Stork® (single slot mesh und mesh 150) von 3 mm Durchmesser aufgefangen. Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte mit 5% Uranylacetat in destilliertem Wasser für 15 min und Bleizitrat (Reynolds 1963) für 2 min. Durch Elektronenmikroskope vom Typ EM 201 (Philips) oder Typ CM 100 (Philips) wurden die Ultradünnschnitte fotografisch ausgewertet.

4.2.5 Kontrollen der Elektronenmikroskopie

Parallel zu Protokoll B wurden Kontrollinkubationen in substratfreien Medien durchgeführt. Weiterhin konnten bei der Inkubation des 1. Antikörpers einige Vibratomschnitte mit Rabbit-Anti-VDR 1:2000 und Rabbit-Anti-CGRP 1:2000 inkubiert werden.

4.3 Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich, A 0169
Antikörper: ABC-Kit (Avidin-Biotin-Complex)	Vector Laboratories, Pk 6100
Goat-Anti-Rabbit Biotin	DAKO, E 0432
NGS (Normal Goat Serum)	Vector Laboratories, S-1000
Rabbit-Anti-CGRP	Peninsula IHC 6006
Rabbit-Anti-CRF	Peninsula IHC 8561
Rabbit-Anti-VDR	Chemicon MAB 1360

Blei(2)nitrat	MERCK 7398
BSA	Sigma A-9647
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma D-5637
Dimethyldichlorosilan	FLUKA 40150
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	FLUKA 20840
Diethylether	BOOM B.V. 50023
CWFS Gelatine	Aurion 900.033
„Epon“: Glyzidether 100	Serva 21045
DDSA	Serva 20755
MNA	Serva 29452
DMP-10	Polysciences 0504
Essigsäure 100% (Eisessig)	BOOM B.V. 51830
Ethanol (Ethylalkohol absolut)	Nummer 404, Nedalco, Bergen op Zoom, NL
Glutaraldehyd, EM grade	Polysciences 01909
Glycin	Sigma G 7126
Goldchloride	MERCK 1582
Heparine Leo (Heparine-natrium)	LEO Pharmaceutical Products B.V., Weesp., NL
Kaliumferrozyanid (K ₄ Fe(CN) ₆)	MERCK 4984
Lysine (L-Lysine-HCl)	SERVA 28200
Methanol	MERCK 6009
Natriumacetat	MERCK 6267
Natriumborohydride	Sigma-Aldrich S 9125
Natriumchlorid	Baker 0277
Natriumdihydrogenphosphat	Baker 0303
Natriummonohydrogenphosphat	Baker 0326
Natriumthioglykolat	Sigma-Aldrich T-0632
Natriumthiosulfat	MERCK 6516
Natriumziträt	MERCK 6448
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Aurion EMS 19115

Paraformaldehyd	MERCK 4005
Pentobarbital	Apotheek Academisch Ziekenhuis Groningen, NL
Pikrinesäure	FLUKA 80450
Propylenoxid	ACROS Organics 149620025
Saccharose (99,5 % Reinheit)	Baker 0334
Salzsäure 32 %	MERCK 319
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	MERCK 8382
Triton X-100	MERCK 108605
Uranylacetat	MERCK 8473
Wasserstoffperoxyd	MERCK 7210
Xylol	MERCK 108685

5 Ergebnisse

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Optimierung der Preembedding Technik für postnatale Cerebelli

Es wurden zum licht- und elektronenmikroskopischen Vergleich die postnatalen Cerebelli der Wistar-Ratten verwendet. Die ausgewachsenen Tieren, älter als 21 Tage, wurden mit Triton X-100 für die Inkubationen mit dem ersten, zweiten und dritten Antikörper behandelt. Bei der Arbeit mit den jungen postnatalen Cerebelli eignete sich diese Technik nicht. Die Zellmembranen waren durch die Behandlung mit Triton X-100 geweitet und teilweise zerstört. Die CRF-positiven Reaktionsprodukte waren somit unspezifisch im cerebellären Cortex verteilt. Die Ergebnisse dieser Präparate waren durch deutliche morphologische und qualitative Mängel nicht zu verwerten. Im Protokoll B und C wurde die Triton X-100 Konzentration reduziert und damit morphologische Verbesserungen erzielt. Bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Cerebelli aller Altersstufen mit den Protokollen A, B und C behandelt. Dabei war die Markierung der neuronalen Elemente spezifisch. Die Reaktionsprodukte wiesen kaum unspezifische Reaktionen zu zellulären Schichten des cerebellären Cortex auf.

5.1.2 Vergleich der Osmium mit der Phend Methode

Zu Beginn wurde mit zwei Einbettungsmethoden gearbeitet. Die gebräuchliche Technik war eine Fixierung der Vibratomschnitte mit Osmium (Protokoll C). Mit dieser Methode konnten die Cerebelli elektronenmikroskopisch optimal dargestellt werden. Da Osmium eine gesundheitsschädliche Wirkung besitzt, wurde für die Fixierung der Präparate nach alternativen Methoden gesucht. Somit wurden, bis auf den Einbettungsschritt, die gleichen Cerebelli mit den gleichen Inkubationen behandelt. Außerdem konnte eine Kontrollgruppe ohne Inkubation des ersten Antikörpers mitgeführt werden.

Der Vergleich zwischen einer Fixierung mit Osmium und der Phend Methode (Phend et al. 1995) wurde elektronenmikroskopisch beurteilt, da im LM mögliche spezifische Reaktionen mit beiden Methoden vorhanden waren. Die EM Darstellung der Reaktionsprodukte nach der Phend Methode war unzureichend.

Zum lichtmikroskopischen Vergleich der Verteilung und Lokalisation von CRF werden die postnatalen Cerebelli (PD) der Wistar-Ratten herangezogen. Die Gefrierschnitte wurden unter standardisierten Bedingungen nach den Protokollen A und B behandelt. Die angefertigten Schnitte konnten danach mit Rabbit-Anti-CRF 1:1000 inkubiert werden. Bei der Auswertung wurde der gesamte cerebelläre Cortex betrachtet. Dabei konnte ein erster allgemeiner Eindruck helfen, die Gesamtverteilung im Cortex einzuschätzen. Als zweiter Schritt wurden die Kriterien für die markierten Gebiete festgelegt, dabei musste auf positiv angefärbte Strukturen geachtet werden. Die Reaktionsprodukte sind unregelmäßig in Größe, Form und Verteilung. Es imponieren lichtmikroskopisch dunkel gefärbte Strukturen, die keine Relation zu zellulären Elementen des cerebellären Cortex aufweisen. Die fotografisch dargestellten Gebiete verdeutlichen lichtmikroskopisch den entwicklungsspezifischen Verteilungs- und Lokalisierungsgrad der CRF enthaltenden Strukturen.

PD 3: Im gesamten Cortex sind nur vereinzelt Reaktionsprodukte zu beschreiben. Die Abbildungen 5.2-1 und 5.2-2 zeigen den cerebellären Cortex einer drei Tage alten Ratte (PD 3). Zu erkennen sind die äußere Keimschicht (EGL), das Stratum ganglionare (PL), das Stratum granulosum (GL) und die weiße Substanz (WM). Die Reaktionsprodukte befinden sich vorwiegend im Stratum granulosum und sehr vereinzelt im Stratum ganglionare. In der Abb. 5.2-2 wird deutlich, dass die Reaktionsprodukte unterschiedliche Form und Größe aufweisen. Die dunkel gefärbten Auftreibungen sind perlenschnurartig hintereinander angeordnet, wobei sie faserähnliche Strukturen formen. Sie durchziehen das Stratum granulosum in irregulärer Ausrichtung und enden im Stratum ganglionare.

In der äußeren Keimschicht sind keine Reaktionsprodukte zu erkennen. Diese Schicht erscheint optisch homogen mit geringer Darstellung von Zellen oder Zellfragmenten. Weiterhin ist auffällig, dass die Zellkerne sowie das Zytoplasma der Purkinje- und Körnerzellen ebenfalls dunkel dargestellt sind. Die substratfreien Kontrollen zeigen eine ähnliche Verfärbung der Purkinje- und Körnerzellen ohne die Darstellung der faserähnlichen Strukturen, welche CRF-positiv angefärbt sind.

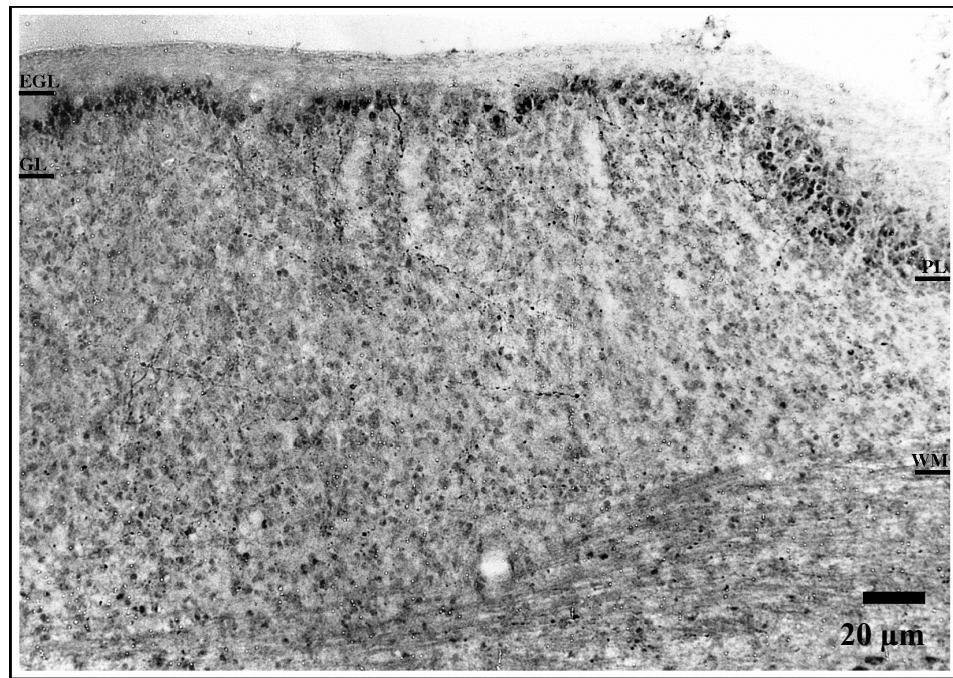


Abb. 5.2-1
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer drei Tage (PD 3) alten Ratte
 EGL: Äussere Körnerzellschicht, GL: Körnerzellschicht, PL: Purkinjezellschicht, WM: Weisse Substanz

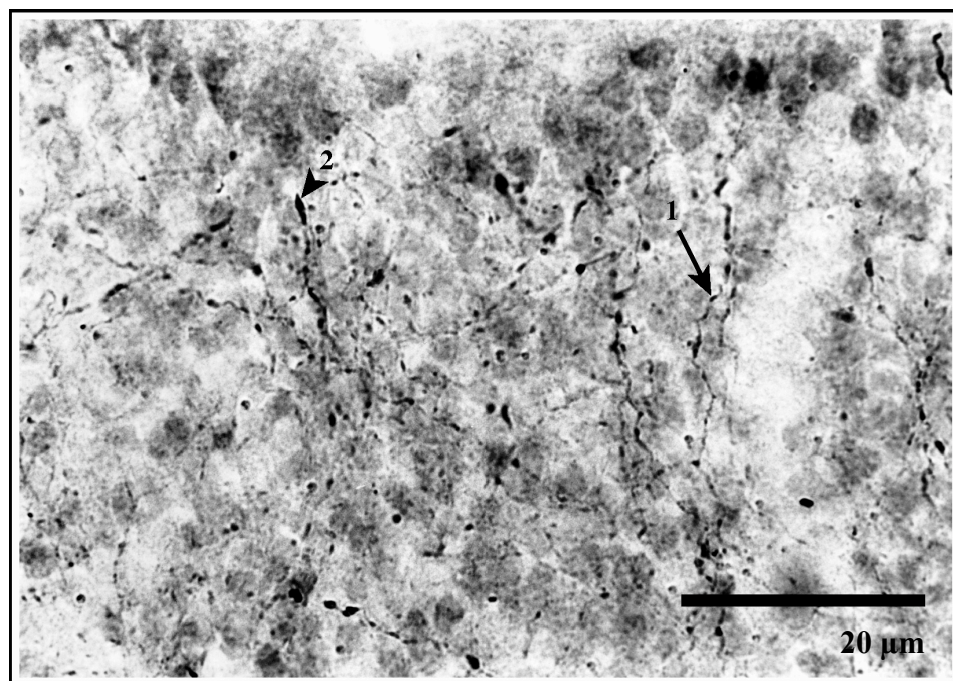


Abb. 5.2-2
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären Cortex der Abb. 5.2-1
 CRF-Aktivität ist in entwickelten Kletterfasern (1) und Moosfaserrosetten (2) der Körnerzellschicht nachweisbar

Die Pfeile 1 und 2 in Abb. 5.2-2 weisen auf lichtmikroskopisch dargestellte Kletterfasern (1) und Moosfaserrosetten (2) hin. Für die Identifizierung dieser neuronalen Elemente sprechen ihre Strukturmerkmale. Die Moosfaserrosette ist eine Varikosität (Aufreibung) der Moosfasern, welche ihre Erregungen auf die Körnerzellen überträgt. Diese senden Parallelfasern zu den Dendriten der Purkinjezellen. Die Rosetten der Moosfasern stellen relativ große Varikositäten im Stratum granulosum dar. Das Ausmaß dieser Strukturen ist mit einem postnatalen Alter von drei Tagen (PD 3) noch relativ gering. Die Kletterfasern verlaufen durch das Stratum granulosum und ganglionare. Ihre Ausläufer durchziehen bei dieser Lebenszeit ungerichtet das Stratum granulosum, da die neuronalen Elemente des cerebellären Cortex relativ unvollständig ausgebildet sind.

Morphologisch fällt auf, dass die Purkinjezellschicht in diesem Stadium mehrschichtig ist. Dies wird typischerweise mit PD 3 beschrieben. Außerdem wurde die EGL dargestellt, welche im Laufe der Entwicklung verschwindet. Die Molekularschicht konnte in diesem Stadium lichtmikroskopisch nicht eindeutig gezeigt werden.

PD 6: Im postnatalen Alter von sechs Tagen (PD 6) werden angefärbte Strukturen im Stratum granulosum und teilweise im Stratum ganglionare beobachtet (Abb. 5.2-3 und 5.2-4). Weitere Rindenabschnitte sind immunhistochemisch nicht auffällig. Die Reaktionsprodukte formen faserähnliche Elemente, welche sich um Zellverbände gruppieren (Abb. 5.2-4). Im Detail wird deutlich, dass die markierten Strukturen nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern als Auftreibungen dominieren. Es können zwei neuronale Systeme unterschieden werden. Die Pfeile 1 und 2 weisen auf Kletterfasern (1) und Moosfaserrosetten (2). Die Kletterfasern erscheinen als gezackte Linien im Stratum granulosum und durchziehen es in kleinen Verbänden. Die Varikositäten der Moosfaser sind durch ihre aufgetriebenen Endigungen zu erkennen. Wiederum dunkel dargestellt sind Purkinje- und Körnerzellen. Zu beachten sind außerdem ungefärbte Aufhellungen, welche lichtmikroskopisch keine Zellelemente enthalten.

Der gesamte Rindenabschnitt erscheint aufgelockert. Die äußere Keimschicht ist verschmälert und die Molekularschicht teilweise zu erkennen. Außerdem ist auffällig, dass die Reaktionsprodukte nur spezifisch nachzuweisen sind. Ihr Vorkommen richtet sich auf bestimmte cerebelläre Schichten.

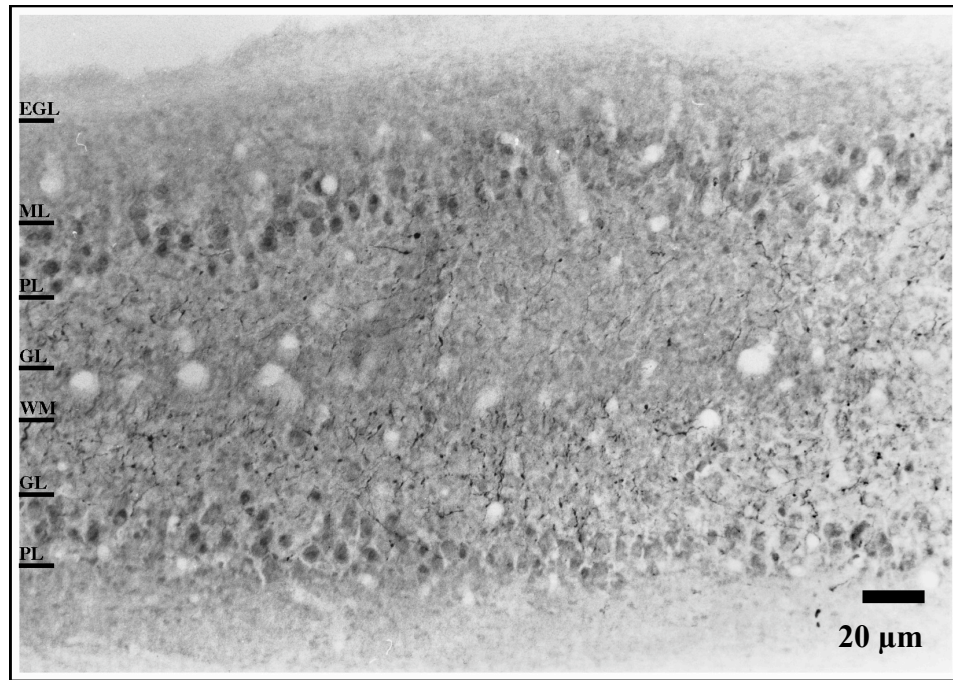


Abb. 5.2-3
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer sechs Tage (PD 6) alten Ratte
 EGL: Äussere Körnerzellschicht, ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht, WM: Weisse Substanz

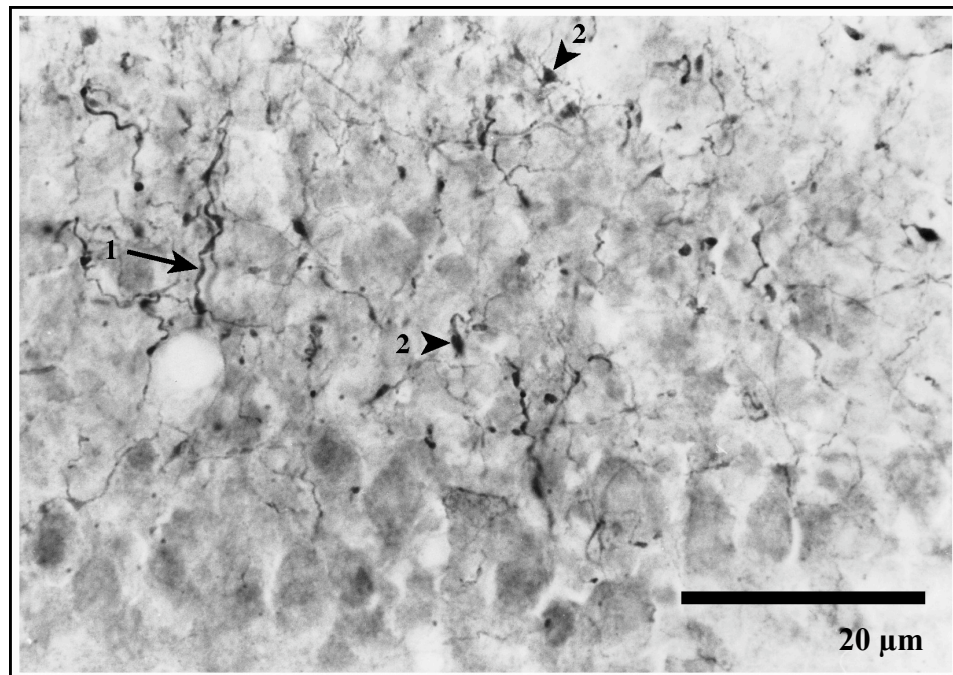


Abb. 5.2-4
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären Cortex der Abb. 5.2-3
 CRF-Aktivität ist in Kletterfasern (1) und Moosfaserrosetten (2) der Körnerzellschicht nachweisbar

PD 9: Mit einem Lebensalter von neun Tagen (PD 9) ändert sich das bisherige Bild (Abb. 5.2-5). In vielen Bereichen des cerebellären Cortex sind neuronale Elemente immunhistochemisch darstellbar. Die Reaktionsprodukte im Stratum granulosum haben deutlich an Größe, Anzahl und Intensität zugenommen. Die CRF-positiven Elemente formen ein weit reichendes netzartiges Fasergeflecht (Abb. 5.2-6). Vereinzelt sind angefärbte Faseranteile im Stratum ganglionare, in der weißen Substanz sowie im Stratum molekulare sichtbar. Interessant ist, dass die CRF-Aktivität, wie schon in den vorangegangenen Abb. (Abb. 5.2-4), scheinbar ungeordnet im Stratum granulosum auftritt. Außerdem sind in Abb. 5.2-6 die neuronalen Elemente (1) viel größer und umfangreicher dargestellt, als in Abb. 5.2-4. Die Abb. 5.2-5 lässt erkennen, dass die CRF-positiven Reaktionsprodukte in bestimmten Gebieten des cerebellären Cortex in einer höheren Konzentration vertreten sind.

Unter lichtmikroskopischer Sicht (Abb. 5.2-5) grenzt sich das Stratum molekulare deutlich von der äußeren Keimschicht ab. Die drei Rindenabschnitte des Cerebellums sind bei dieser immunhistochemischen Darstellung dunkel dargestellt. Da in der äußeren Keimschicht und in der weißen Substanz nur wenige Reaktionsprodukte vorhanden sind, zeigen sich diese Gebiete im Gegensatz zu den Rindenabschnitten aufgehell.

PD 12: Die folgenden Abbildungen (Abb. 5.2-7 und 5.2-8) zeigen das Cerebellum einer 12 Tage alten Ratte (PD 12). Die angefärbten neuronalen Strukturen (1) sind deutlich ausgebildet und gruppieren sich korbartig um das Soma der Purkinjezellen. Die quantitative Darstellung der Reaktionsprodukte im Stratum granulosum ist zugunsten des Stratum ganglionare verschoben. Die immunhistochemisch dargestellten Strukturen umspannen die Purkinjezellen, wobei die neuronalen Elemente sehr deutlich zu erkennen sind. Ihre Größe, Intensität und Anzahl (Abb. 5.2-8) hat im Vergleich zur Abb. 5.2-6 zugenommen. Das Fasersystem erstreckt sich vom Stratum granulosum über das Stratum ganglionare bis ins Stratum molekulare. Die Strukturen formen ausgehend von den Purkinjezellen ein Fasernetzwerk in Richtung Stratum molekulare (Abb. 5.2-8), wobei die Kletterfasern überwiegen. Die Moosfasern und ihre Rosetten sind deutlich im Stratum granulosum zu beobachten.

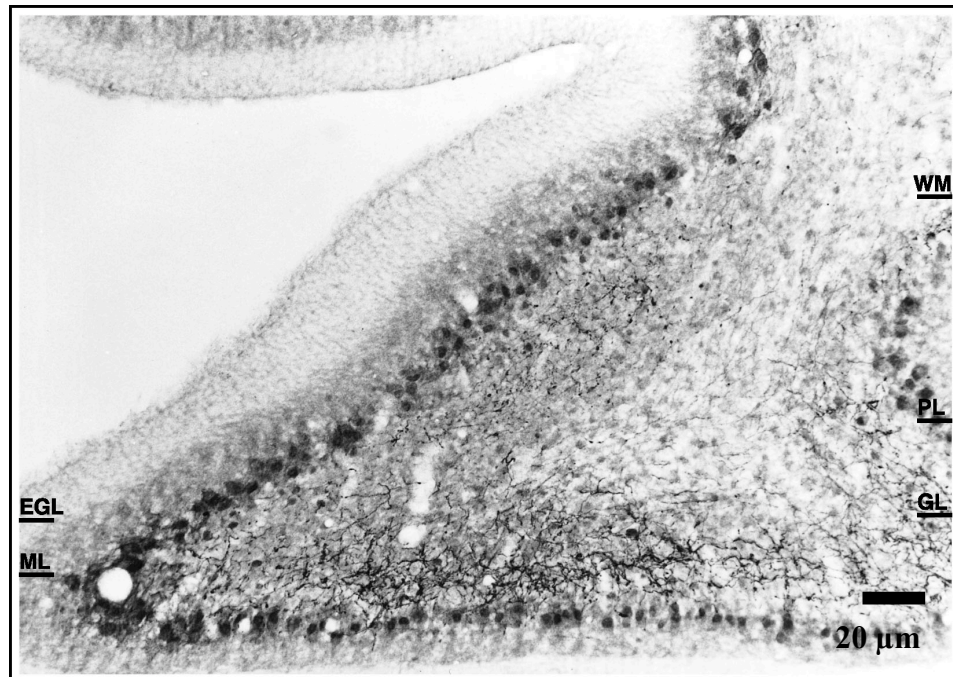


Abb. 5.2-5
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer neun Tage (PD 9) alten Ratte
 EGL: Äussere Körnerzellschicht, ML: Molekularschicht, WM: Weisse Substanz, GL: Körnerzellschicht, PL: Purkinjezellschicht

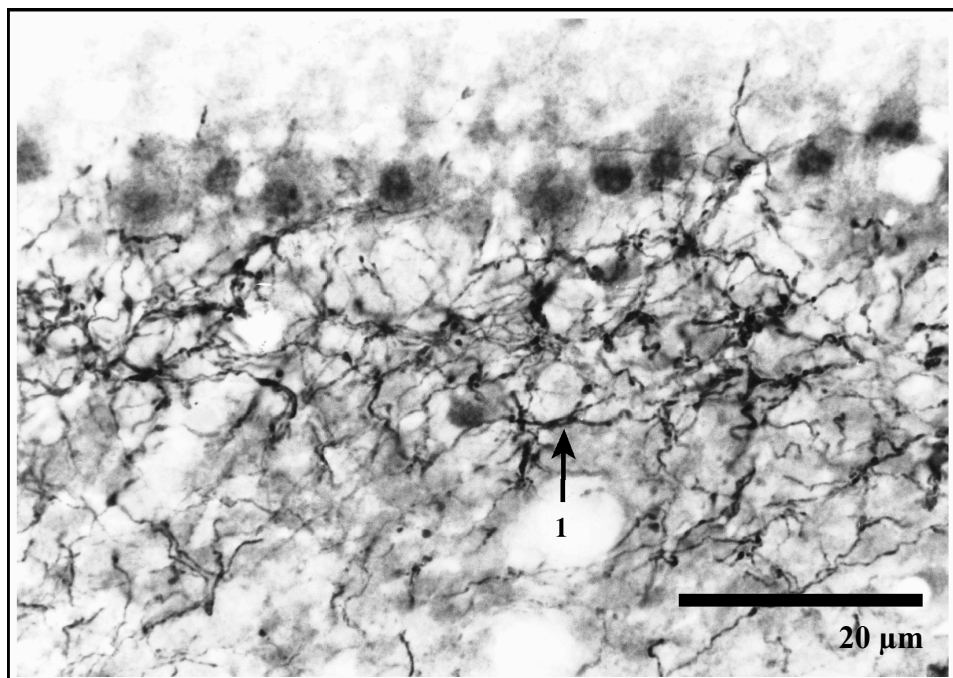


Abb. 5.2-6
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären Cortex der Abb. 5.2-5
 CRF-Aktivität ist in Kletterfasern (1) der Körnerzellschicht nachweisbar

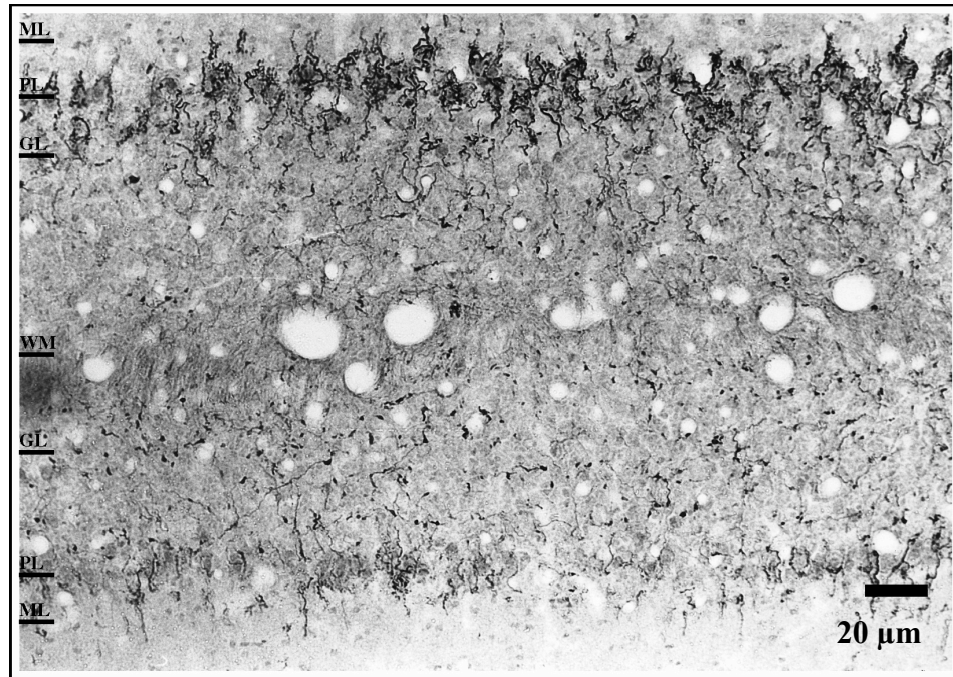


Abb. 5.2-7
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer 12 Tage (PD 12) alten Ratte
 ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht, WM: Weisse Substanz

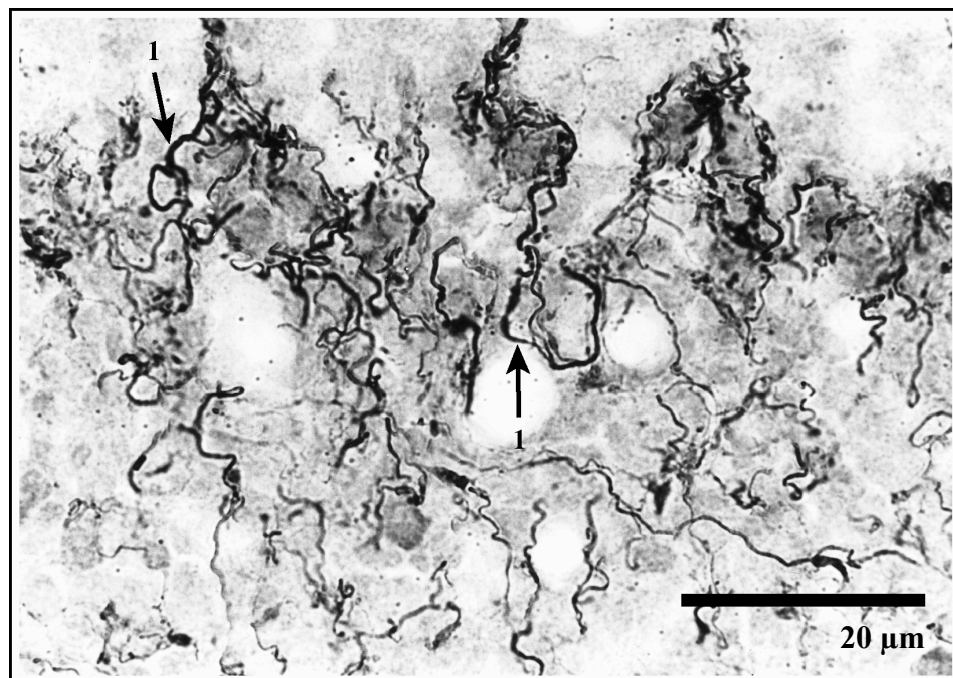


Abb. 5.2-8
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären Cortex der Abb. 5.2-7
 CRF-Aktivität ist in Kletterfasern (1) überwiegend in der Purkinjezellschicht nachweisbar

Auffallend sind (Abb. 5.2-7) optisch leere Gebilde, welche nicht von zellulären Strukturen durchzogen werden. Trotz dieser Veränderung sind ebenfalls angefärbte Fasern im Stratum granulosum sichtbar (Abb. 5.2-8), meist Moosfasern. Auch bei diesem Präparat ist anzumerken, dass die CRF-positiven Strukturen nicht in allen Rindenabschnitten in gleicher Verteilung zu beobachten sind. Es finden sich ebenfalls Abschnitte, in denen die neuronalen Elemente in geringerer Konzentration nachzuweisen sind. Es können nun in allen Rindenabschnitten markierte Fasersysteme gezeigt werden. Die Purkinjezellen und ein Teil der Körnerzellen erscheinen auch in diesem Präparat dunkel gefärbt.

PD 15: Am 15. postnatalen Tag (PD 15) sind die neuronalen Elemente im gesamten cerebellären Cortex vertreten (Abb. 5.2-9). Die durch CRF dargestellten Fasersysteme sind in geringer Zahl im Stratum ganglionare (wie Abb. 5.2-8) nachzuweisen. Im Stratum granulosum und molekulare zeigen sich die Reaktionsprodukte wiederum in Kletter- (1) und Moosfasern mit ihren typischen Rosetten (2). Die unterschiedliche Struktur beider Fasersysteme ist deutlich zu erkennen. Die afferenten Systeme sind im Stratum granulosum und Stratum molekulare zu identifizieren, wobei die Faseranteile mit ihren Ausläufern entlang ausgebildeter Strukturen verlaufen. Im Stratum molekulare (Abb. 5.2-9 und 5.2-10) verlaufen die Kletterfasern (1) entlang eines sich ausbildenden Dendritenbaumes. Die Moosfasern und ihre Varikositäten erscheinen immunhistochemisch deutlich im Stratum granulosum.

Außerdem sind weiterhin optisch leere runde Gebilde zu beobachten, die immunhistochemisch keine Reaktionsprodukte aufweisen. Aus Abb. 5.2-9 geht hervor, dass die markierten Fasersysteme säulenartig im cerebellären Cortex ausgerichtet sind. Zwischen zwei dieser „Säulen“ befindet sich ein Gebiet, welches durch weniger Reaktionsprodukte auffällt. Die Purkinje- und Körnerzellen sind auch in diesem Stadium dunkel dargestellt.

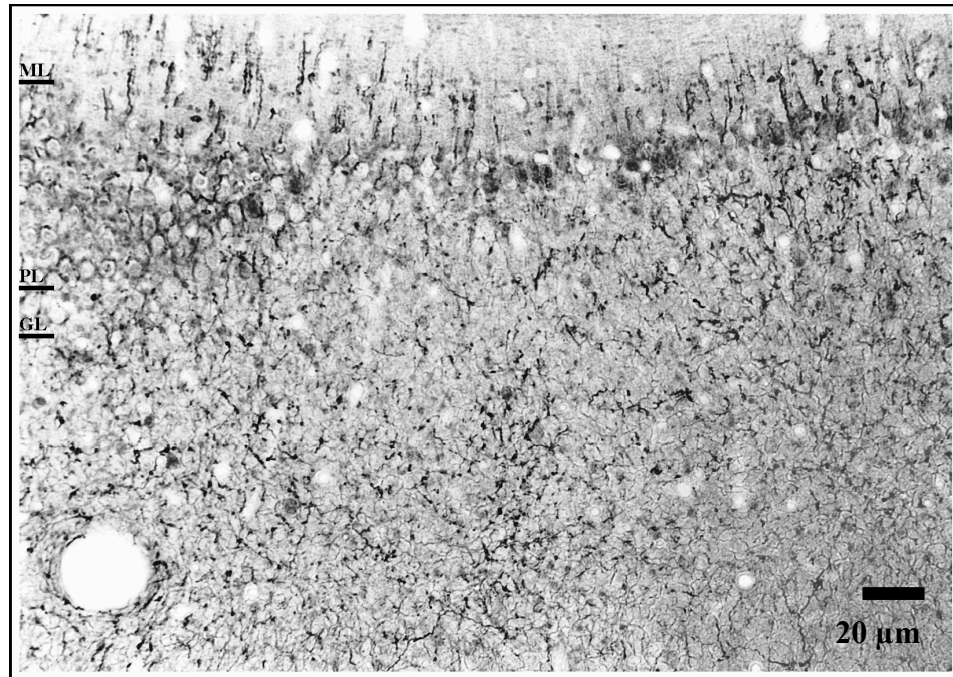


Abb. 5.2-9
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer 15 Tage (PD 15)
 alten Ratte
 ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht

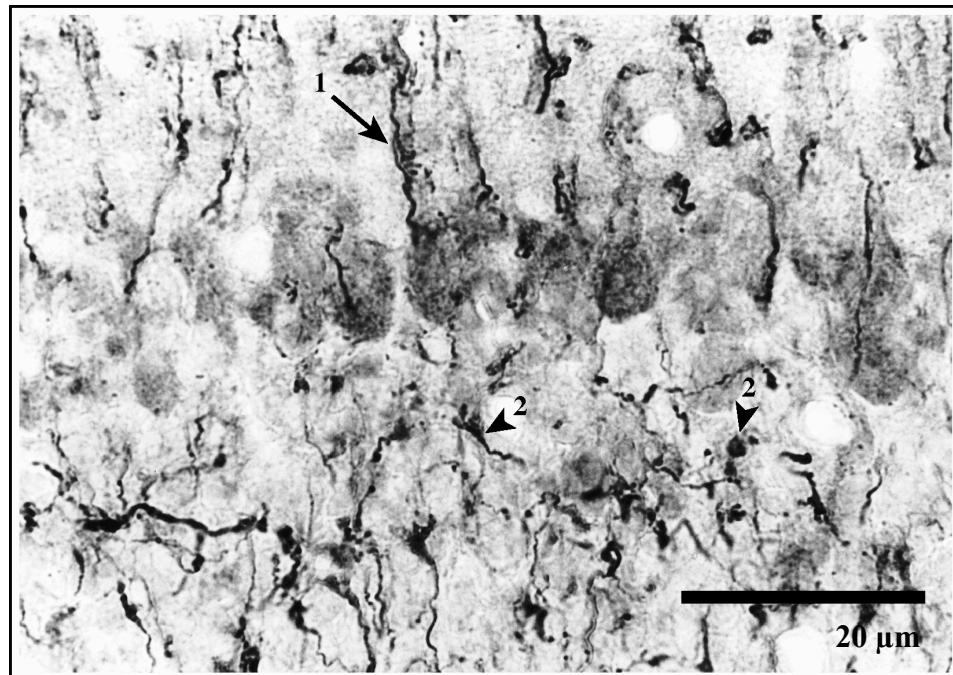


Abb. 5.2-10
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären Cortex der Abb. 5.2-9
 CRF-Aktivität ist in Kletterfasern (1) der Molekularschicht und in Moosfasern mit ihren
 Rosetten (2) nachweisbar

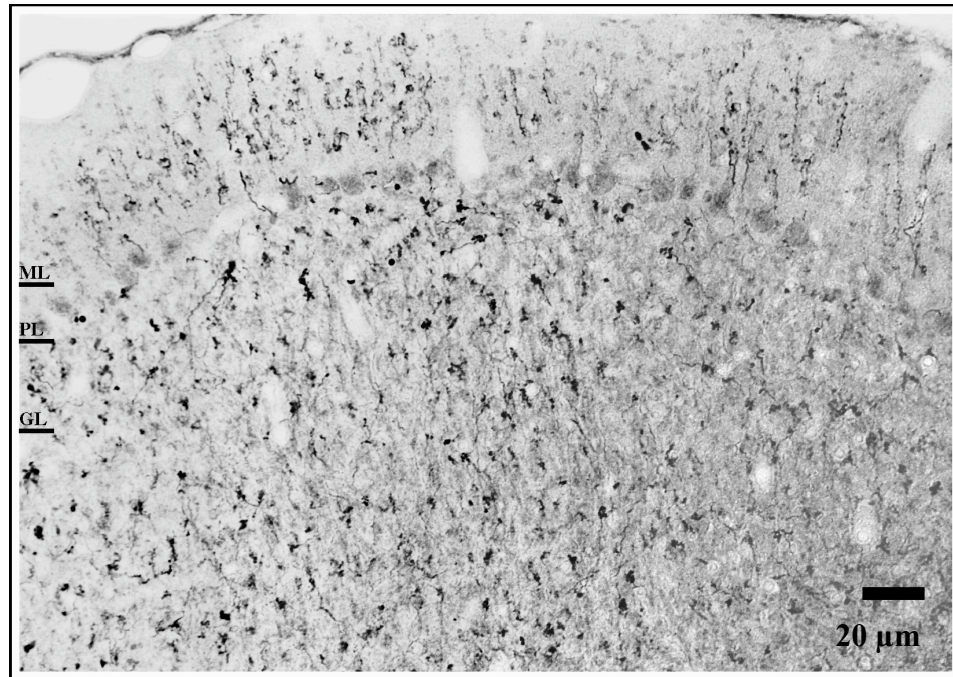


Abb. 5.2-11
Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer 30 Tage (PD 30) alten Ratte
ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht

PD 30: Mit fortgeschrittenem Lebensalter, PD 30, erscheinen die markierten CRF-positiven Strukturen in großer Anzahl im Stratum granulosum und molekulare (Abb. 5.2-11). Die Kletterfasern ziehen dabei ausgehend vom Stratum granulosum über das Stratum ganglionare in das Stratum molekulare. Dort inserieren sie an die Purkinjezellendriten.

Die Pfeile (Abb. 5.2-12) weisen auf deutlich erkennbare Kletter- (1) und Moosfasern (2) hin. Im Stratum ganglionare sind nur vereinzelt Faseranteile immunhistochemisch dargestellt (Abb. 5.2-12). Die betreffenden neuronalen Elemente verlaufen entlang der Purkinjezellsomata und enden im Stratum molekulare. Außerdem ist auffällig, dass die Moosfasern mit ihren Rosetten im Stratum granulosum in unterschiedlichen Ausrichtungen verlaufen. Im Stratum molekulare sind die Reaktionsprodukte in den Kletterfasern entlang des Purkinjezellendriten angeordnet (Abb. 5.2-11). Sie verlaufen, wie auch in Abb. 5.2-9 gezeigt, in längs orientierter Ausrichtung durch das Stratum molekulare. Die Moosfaserrosetten (2) in Abb. 5.2-12 haben an Umfang zugenommen. Eine säulenförmige Ausrichtung der Reaktionsprodukte ist in Abb. 5.2-11 zu erkennen.



Abb. 5.2-12
 Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären
 Cortex der Abb. 5.2-11
 CRF-Aktivität ist in Kletterfasern (1) der
 Molekularschicht sowie in Moosfaserrosetten (2)
 nachweisbar

In Abb. 5.2-12 sind dunkel dargestellte Zellen im Stratum ganglionare zu erkennen. Dies sind meist Zellkerne der Purkinjezellen. Außerdem sind lichtmikroskopisch helle Gebiete sichtbar, die immunhistochemisch keine Reaktionsprodukte aufweisen. Eine geringe Abnahme der Konzentration von Reaktionsprodukten im Vergleich zu PD 15 ist bereits zu erkennen.

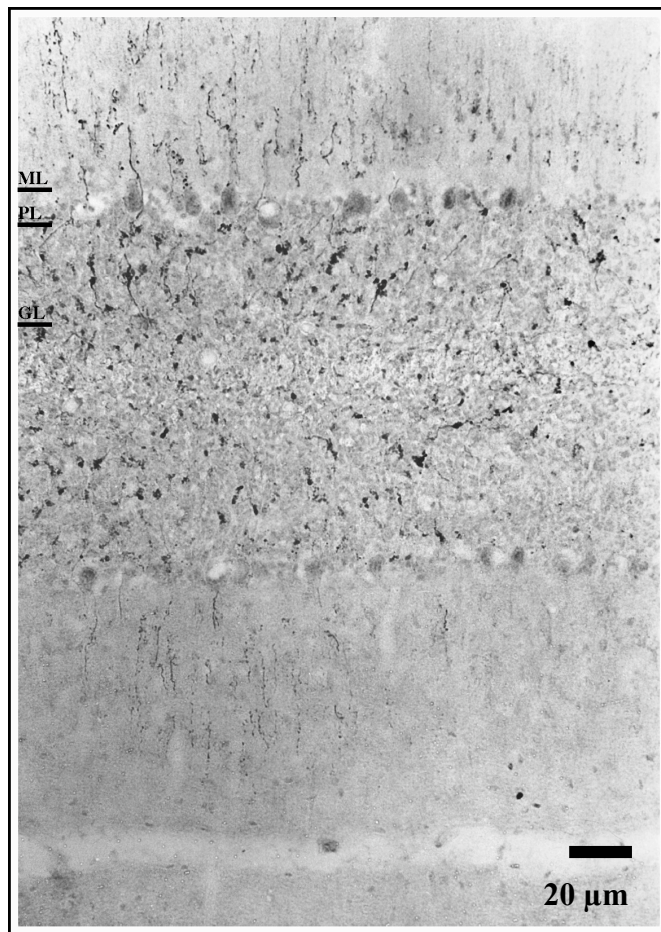


Abb. 5.2-13
 Lichtmikroskopische (LM) Darstellung des cerebellären Cortex einer 40 Tage (PD 40) alten Ratte
 ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, GL: Körnerzellschicht

PD 40: Die Abbildungen 5.2-13 und 5.2-14 zeigen die CRF-Verteilung im cerebellären Cortex einer 40 Tage alten Ratte (PD 40). Die markierten Strukturen haben deutlich an Intensität abgenommen und sind in allen drei Schichten des cerebellären Cortex nachweisbar. Die Größe der immunhistochemisch dargestellten neuronalen Elemente ist dabei im Vergleich zu Abb. 5.2-12 konstant geblieben. Es ist zu erkennen, dass sich die markierten Fasern ausgehend vom Stratum granulosum durch das Stratum ganglionare bis ins Stratum molekulare erstrecken (Abb. 5.2-14). Im Stratum granulosum enden die Moosfaserosetten (2) mit ihren großen Varikositäten (Abb. 5.2-14). Ihre immunhistochemische Intensität tritt stärker hervor als die der Kletterfasern (1) im Stratum molekulare.

Die neuronalen Strukturen, wie Kletterfasern (1) und Moosfaserrosetten (2), sind mit PD 40 deutlich in Abb. 5.2-14 dargestellt. Interessanterweise ist die Anzahl der neuronalen Elemente im Vergleich zu PD 15 vermindert, wobei die Größe und die Intensität der Strukturen konstant bleibt.

Lichtoptisch sind wiederum Purkinjezellkerne zu erkennen, die immunhistochemischen Verfahren unspezifisch dargestellt wurden. Außerdem zeigen sich grossenteils im Stratum granulosum dunkel gefärbte Zellen und Zellfragmente.

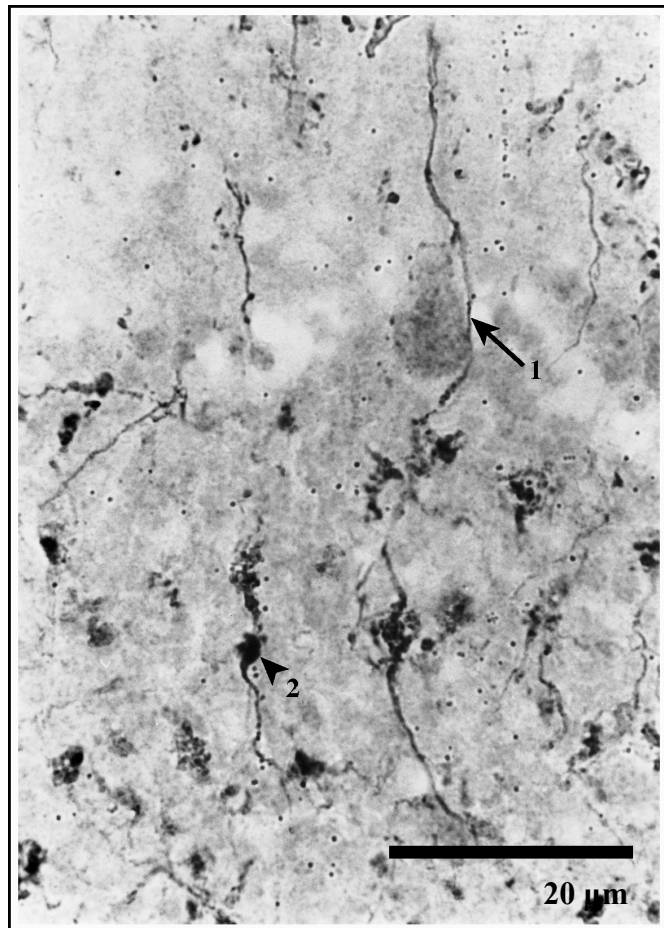


Abb. 5.2-14
Detailaufnahme der LM Darstellung des cerebellären
Cortex der Abb. 5.2-13
CRF-Aktivität in Kletterfasern (1) sowie in
Moosfaserrosetten (2)

Die Abb. 5.2-15 bis 5.2-21 zeigen fotografische Ausschnitte des cerebellären Cortex in verschiedenen Lebensstadien der Wistar-Ratte in einer 64-fachen Vergrößerung. Für eine übersichtlichere Darstellung der CRF markierten Strukturen wurden diese, ausgehend von den fotografischen Vorlagen, in den Abb. 5.2-15a bis 5.2-21a nachgezeichnet. Mit Hilfe dieser Technik kann die Verteilung und Lokalisation von CRF in den neuronalen Elementen einfacher bestimmt werden. Die zusätzlich skizzierten Somata der Purkinjezellen dienen dabei als Orientierung im cerebellären Cortex.

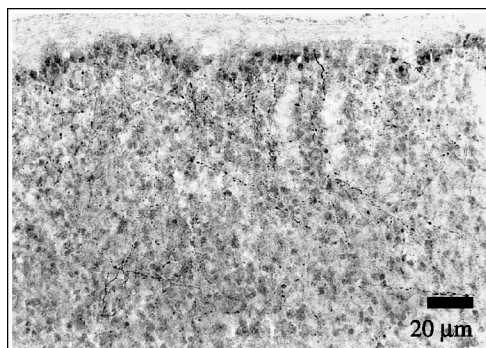


Abb. 5.2-15 PD 3
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären Cortex eine 3 Tage alten Ratte

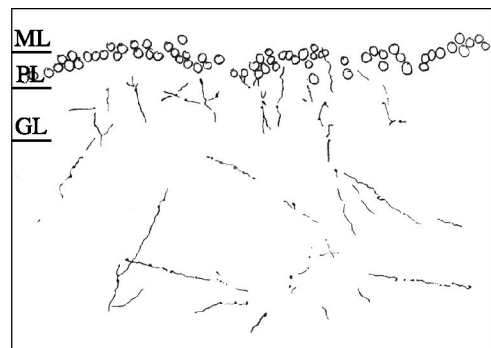


Abb. 5.2-15a, Skizzierung der Reaktionsprodukte aus Abb. 5.2-15

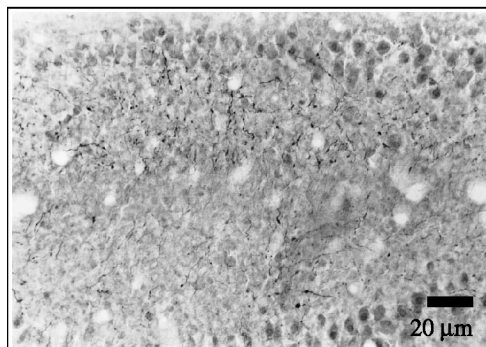


Abb. 5.2-16 PD 6
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären Cortex eine 6 Tage alten Ratte

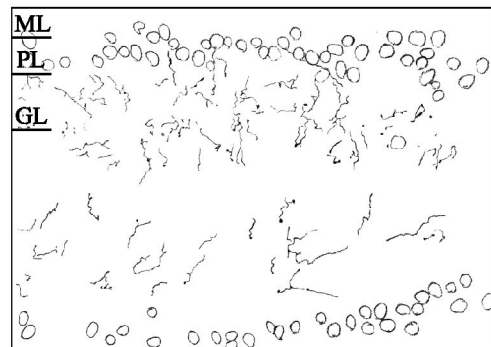


Abb. 5.2-16a, Skizzierung der Reaktionsprodukte aus Abb. 5.2-16

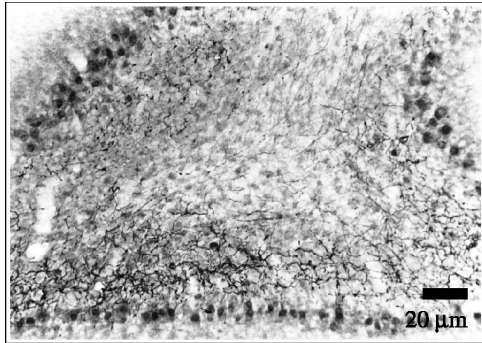


Abb. 5.2-17 PD 9
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären
Cortex eine 9 Tage alten Ratte

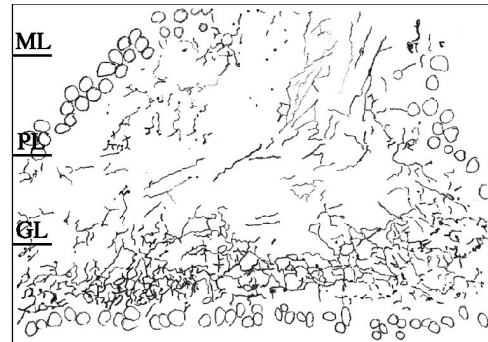


Abb. 5.2-17a, Skizzierung der Reaktionsprodukte
aus Abb. 5.2-17

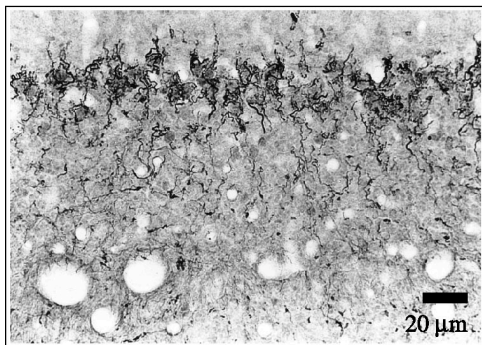


Abb. 5.2-18 PD 12
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären
Cortex eine 12 Tage alten Ratte

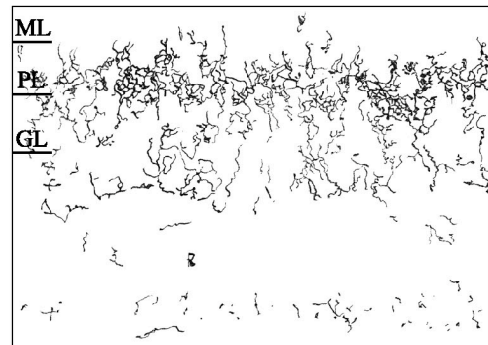


Abb. 5.2-18a, Skizzierung der Reaktionsprodukte
aus Abb. 5.2-18

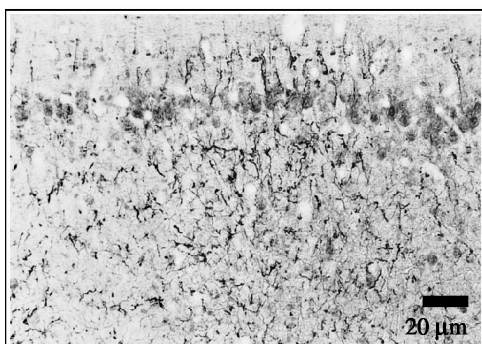


Abb. 5.2-19 PD 15
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären
Cortex eine 15 Tage alten Ratte

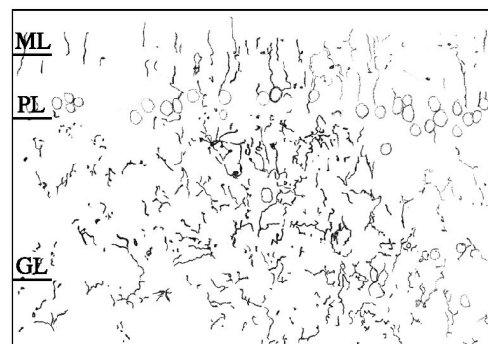


Abb. 5.2-19a, Skizzierung der Reaktionsprodukte
aus Abb. 5.2-19



Abb. 5.2-20 PD 30
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären Cortex eine 30 Tage alten Ratte

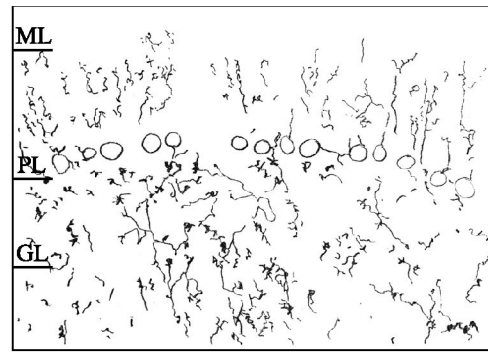


Abb. 5.2-20a, Skizzierung der Reaktionsprodukte aus Abb. 5.2-20

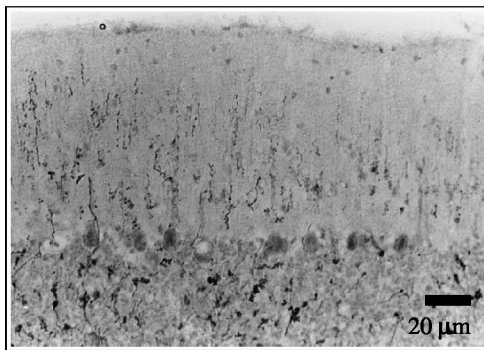


Abb. 5.2-21 PD 40
Lichtmikroskopische Darstellung des cerebellären Cortex eine 40 Tage alten Ratte

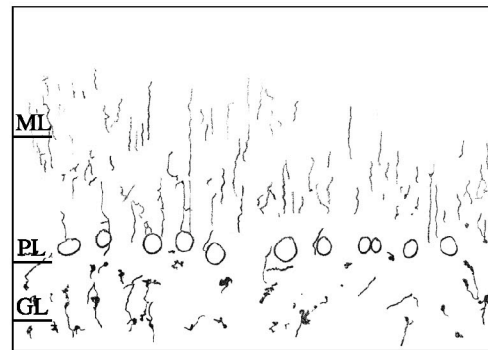


Abb. 5.2-21a, Skizzierung der Reaktionsprodukte aus Abb. 5.2-21

5.2.1 Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Ergebnisse

Die Verteilung und die Lokalisation der CRF-aktiven Strukturen im cerebellären Cortex der Wistar-Ratten ist sehr unterschiedlich. Im Stratum granulosum sind bereits ab einem Alter von drei Tagen CRF-positive Elemente nachweisbar (Abb. 5.2-15a). Zwischen dem 3. und 6. Lebenstag nimmt die Häufigkeit der immunhistochemisch dargestellten Fasersysteme im Stratum granulosum zu (Abb. 5.2-16a). Dies ändert sich am 9. postnatalen Tag. Nun entstehen netzartige Strukturen, welche sehr ausgeprägt im Stratum granulosum verlaufen (Abb. 5.2-17a). Am 12. postnatalen Tag sind die neuronalen Elemente deutlich im Stratum ganglionare zu beobachten. Sie formen ein korbartiges Geflecht um die Somata der Purkinjezellen (Abb. 5.2-18a).

Nach weiteren drei Tagen, PD 15, ist der Anteil der CRF-positiven Fasern verstärkt im Stratum moleculare sichtbar (Abb. 5.2-19a). Die markierten Elemente befinden sich nun im gesamten cerebellären Cortex. Es wird deutlich, dass die CRF-aktiven Strukturen säulenartig angeordnet sind. Bei den adulten Tieren (Abb. 5.2-20a und 5.2-21a), PD 30 und PD 40, zeigen sich die markierten neuronalen Elemente im gesamten Cortex in geringerer Konzentration, wobei auch Gebiete mit höheren CRF-Konzentrationen hervortreten (Abb. 5.2-20a).

Die Skizzierungen verdeutlichen sehr eindrucksvoll den Entwicklungszustand der angefärbten proliferierenden neuronalen Elemente. Bis zum 9. postnatalen Tag sind die Reaktionsprodukte vor allem im Stratum granulosum zu beobachten. Am 12. postnatalen Tag wird die CRF-Aktivität auch im Stratum ganglionare sichtbar. Mit dem 15. postnatalen Tag sind die markierten Strukturen im gesamten cerebellären Cortex nachweisbar.

Die immunhistochemische Darstellung des Neurotransmitters CRF ermöglicht es, die unterschiedlichen Entwicklungsstadien des cerebellären Cortex zu veranschaulichen. Mit PD 3 treten die typischen morphologischen Kriterien für Kletterfasern und Moosfasern mit ihren Rosetten nur unvollständig hervor (Abb. 5.2-2). Im adulten Zustand sind diese neuronalen Elemente jedoch deutlich zu erkennen (Abb. 5.2-12 und Abb. 5.2-14). Diese Entwicklung ist nur durch physiologischen und biochemischen Vorgängen möglich.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Verteilung und Lokalisation von CRF wurden die Cerebelli von 15, 18 und 21 Tage alten Wistar-Ratten herangezogen. Unter standardisierten Bedingungen konnten die Vibratomschnitte (80 μm) nach den Protokollen A und C behandelt werden. Das Ziel dieser Experimente war eine möglichst exakte Beschreibung der markierten neuronalen Elemente. Zudem sollen die lichtmikroskopischen Ergebnisse bekräftigt werden. Bei der Identifizierung der Reaktionsprodukte wurde auf elektronenmikroskopisch dunkel gefärbte Strukturen geachtet, die spezifisch in zellulären Kompartimenten lokalisiert waren.

Die Umgebung der neuronale Strukturen, wie Kletterfasern (Abb. 5.3-1 und 5.3-2), Moosfaserosetten (Abb. 5.3-3 bis 5.3-6) und Bergmann-Gliazellen (Abb. 5.3-7 bis 5.3-10) wurden markiert. Im Elektronenmikroskop konnten die Reaktionsprodukte als dunkel und in unterschiedlicher Größe und Form dargestellte Präzipitate beobachtet werden. Sie befanden sich in Nachbarschaft von Vesikeln (Abb. 5.3-4 und 5.3-6) und zellulären Elementen (Abb. 5.3-1) der afferenten cerebellären Fasersysteme, außerdem im Zytoplasma der Bergmann-Gliazellen.

Kletterfasern: Auffällig war die unterschiedliche Verteilung der Reaktionsprodukte in den neuronalen Elementen, wie z. B. in den Kletterfasern (Abb. 5.3-1 und Abb. 5.3-2). Dieses neuronale afferente Fasersystem durchzieht alle drei Schichten des cerebellären Cortex. Es knüpft synaptische Kontakte mit den distal liegenden Abschnitten des Purkinjezeldendritenbaumes über sogenannte Spines, dendritische Dornen. In seinem Zytoplasma sind tubuläre Elemente, rund geformte Vesikel und teilweise sogenannte "dense core" Vesikel erkennbar. In Abb. 5.3-1 wird auf die CRF-positiv dargestellten Strukturen in den Kletterfasern gewiesen. Es wird deutlich, dass die markierten Präzipitate entlang der zellulären Filamente angeordnet sind. Im Unterschied dazu ist in Abb. 5.3-2 eine andere CRF-Verteilung abgebildet. Die markierten Präzipitate sind in Cluster gruppiert und befinden sich meist in Nachbarschaft von Vesikeln.

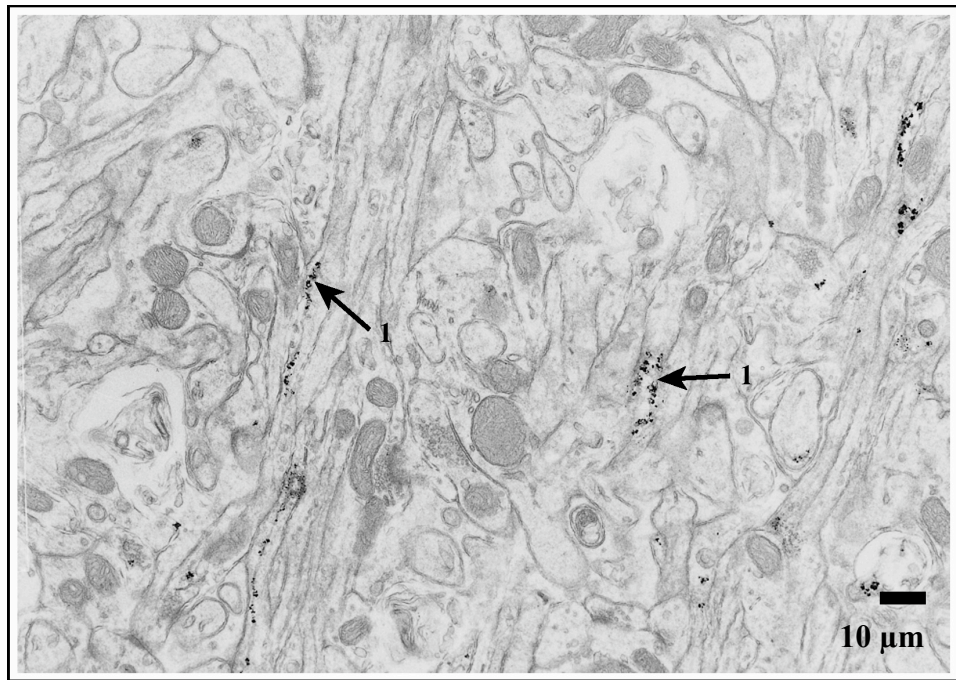


Abb. 5.3-1
Elektronenmikroskopische Darstellung von CRF-positiven Kletterfasern (1) in der Molekularschicht einer 18 Tage (PD 18) alten Ratte

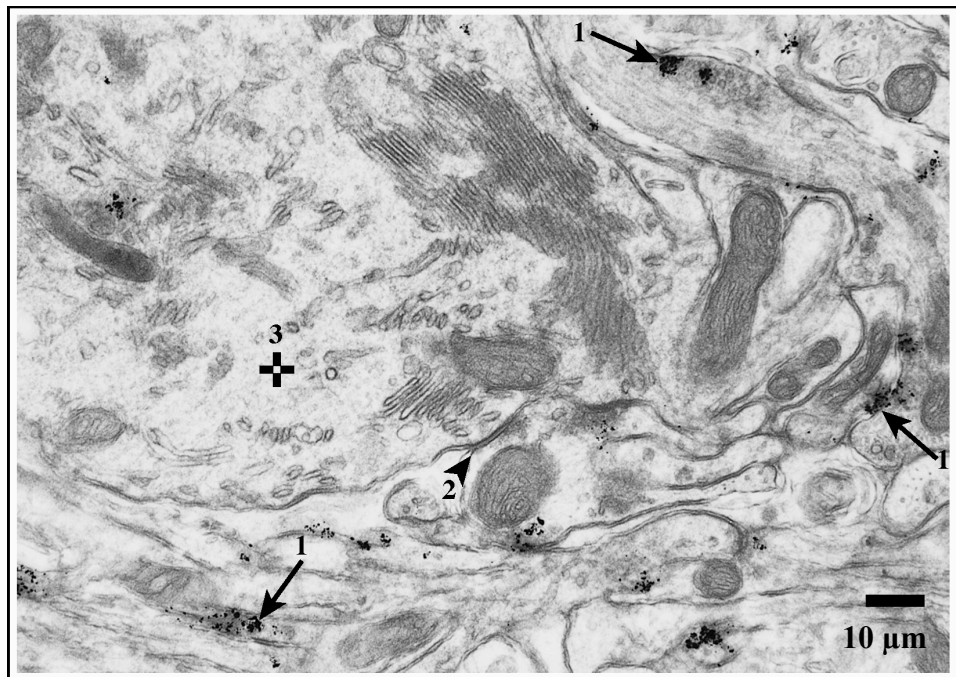


Abb. 5.3-2
Elektronenmikroskopische Darstellung von CRF-positiven Kletterfasern (1), synaptischen Kontakten (2) sowie eines Purkinjezellendriten (3) in der Molekularschicht einer 18 Tage (PD 18) alten Ratte

Die große Struktur (3) inmitten der Abb. 5.3-2 verkörpert einen Purkinjezell dendrit. Zu erkennen sind die typisch lamellenförmig angeordneten Zisternen und der reichlich ausgebildete Golgi-Apparat. Der Dendrit formt dornenartige Ausläufer, sogenannte Purkinjezellspines. Über diese Spines knüpft er synaptische Kontakte mit den afferenten Fasersystemen, wie beispielsweise den Kletterfasern.

Moosfasern: Das zweite afferente System im cerebellären Cortex sind die Moosfasern. Sie formen sogenannte Moosfaserrosetten und bilden über diese Varikositäten synaptische Kontakte mit den Körnerzellen. Diese senden ihre Ausläufer, die Parallelfasern, ebenfalls zu den apikal gelegenen Purkinjezell dendriten. Hierbei inserieren sie an lang ausgebildeten Purkinjezellspines (Abb. 2.4-2). In den Abb. 5.3-3 bis 5.3-6 sind Beispiele für diese Varikositäten dargestellt. Die Moosfaserrosetten (4) zeigen sich als große Auftreibungen im Stratum granulosum (Abb. 5.3-5). Sie verfügen über eine Vielzahl von Zellorganellen, synaptischen Kontakten (2) und Vesikelcluster. Sie geben ihre Informationen über synaptische Kontakte an die Körnerzelle weiter. Diese wiederum entsendet Parallelfasern zu den Purkinjezell dendriten.

Nicht jede Rosette im Stratum granulosum ist spezifisch angefärbt dargestellt. In Abb. 5.3-5 sind zwei Moosfaserrosetten in Umgebung der Körnerzellen zu erkennen, wobei nur eine Rosette spezifische Reaktionsprodukte aufweist. Die Detailaufnahme zeigt (Abb. 5.3-6), dass die markierten Präzipitate sich in spezifischen Regionen der Varikosität befinden. Dabei treten sie bevorzugt in der Nachbarschaft von synaptischen Vesikeln auf (Abb. 5.3-4 und 5.3-6).

Die abgebildeten Strukturen spiegeln die cerebelläre Entwicklung wieder. Interessant ist, dass bestimmte neuronale Strukturen in der Entwicklungsphase synaptische Kontakte besitzen, die bei der adulten Ratte nicht mehr nachzuweisen sind. Abb. 5.3-4 zeigt einen Teil einer Moosfaserrosette, welcher mit einem Purkinjezellspine in Verbindung steht. Dabei bildet sich eine asymmetrische Synapse aus. Der präsynaptische Teil der Moosfaserrosette ist spezifisch mit Reaktionsprodukten dargestellt. Der postsynaptische Teil dieser Synapse, der Purkinjezellspine, ist nicht immunhistochemisch angefärbt.

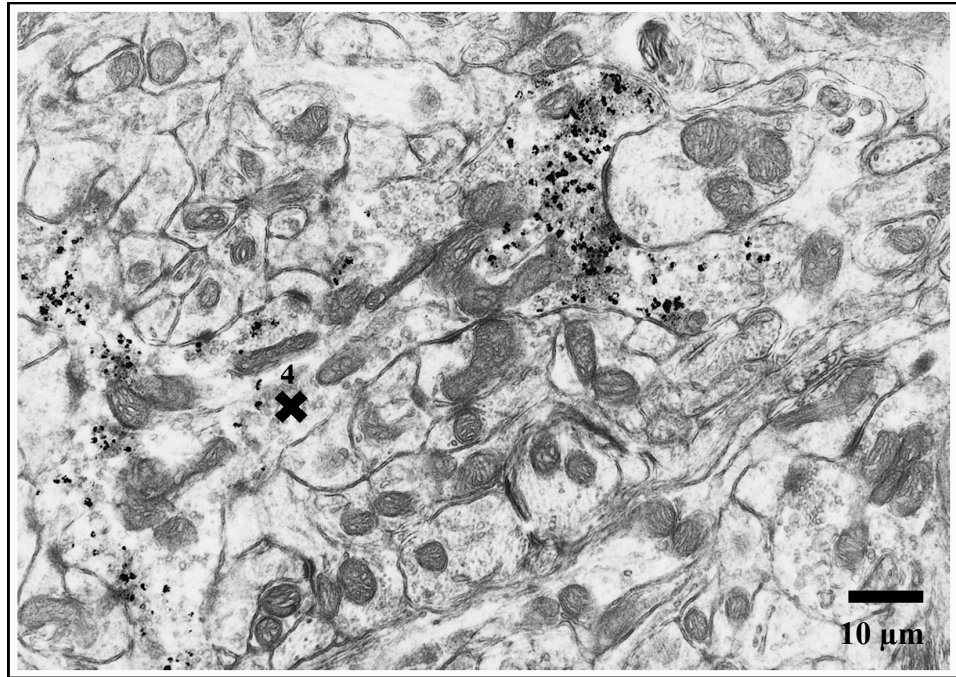


Abb. 5.3-3
Elektronenmikroskopische (EM) Darstellung einer Moosfaserrosette (4) in der Körnerzellschicht einer 18 Tage (PD 18) alten Ratte

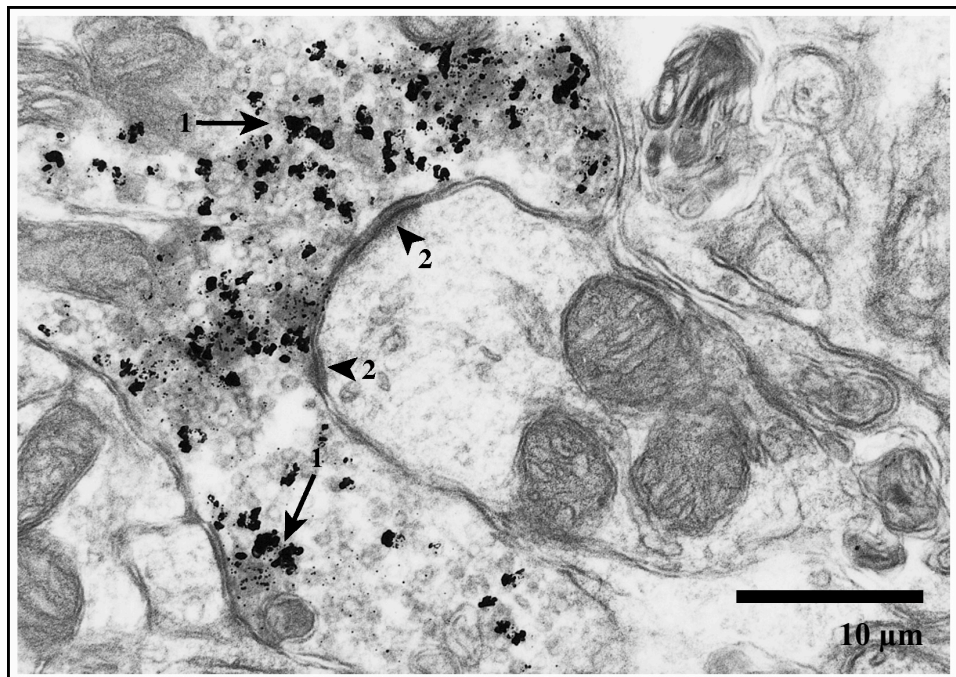


Abb. 5.3-4
Detailaufnahme der EM Darstellung von Abb. 5.3-3.
Darstellung von synaptischen Kontakten (2) der Moosfaserrosette mit einem Purkinjezellspine, wobei eine CRF-Aktivität (1) am präsynaptischen Terminal der Moosfaserrosette nachzuweisen ist

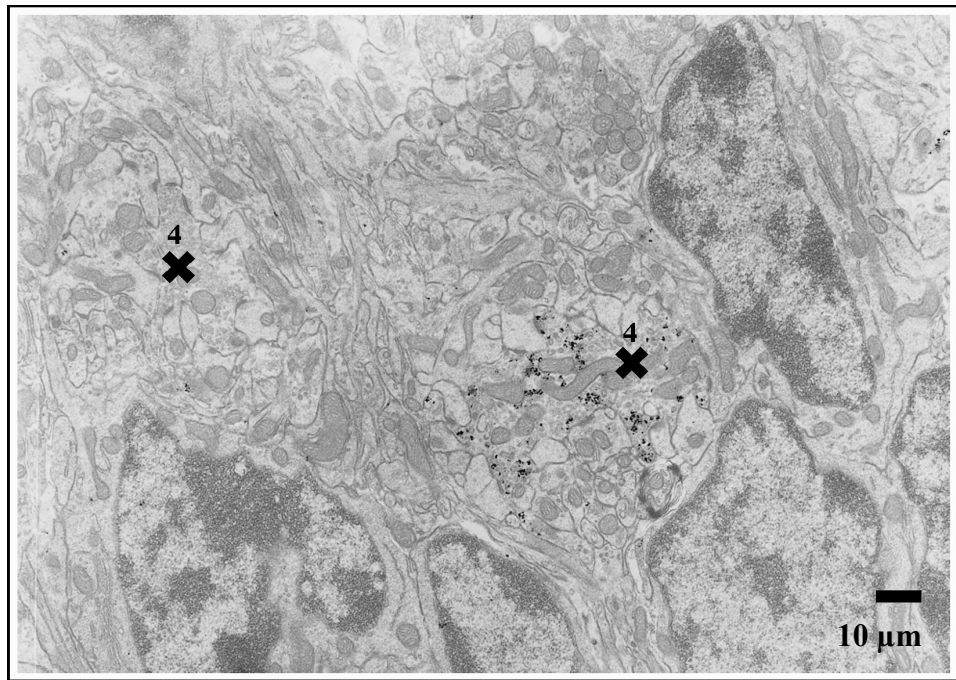


Abb. 5.3-5
Elektronenmikroskopische (EM) Darstellung von Moosfaserrosetten (4) in der Körnerzellschicht einer 18 Tage (PD 18) alten Ratte

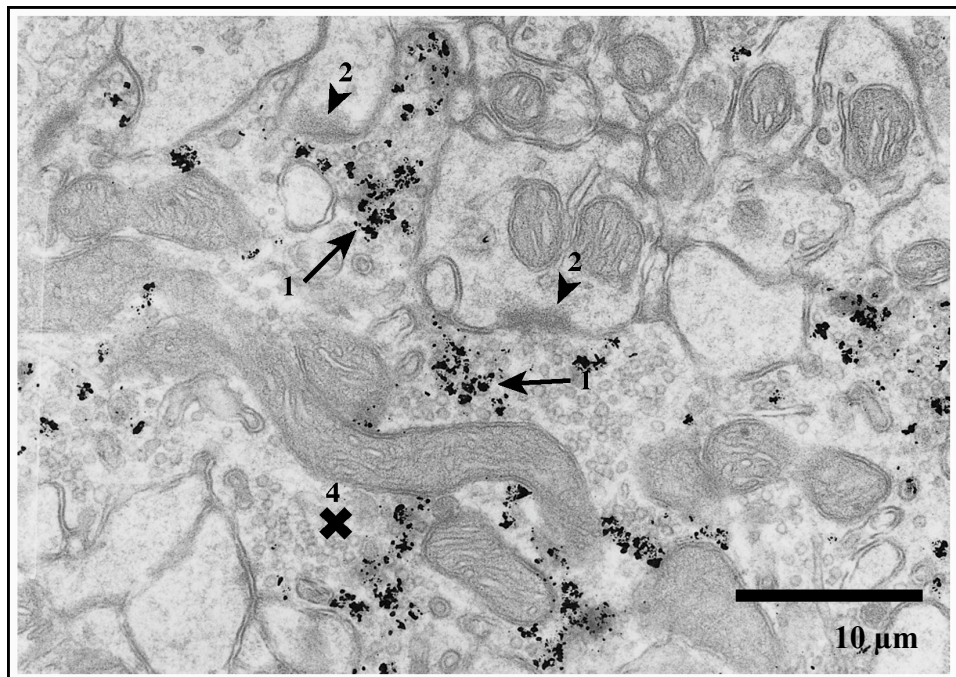


Abb. 5.3-6
Detailaufnahme der EM Darstellung von Abb. 5.3-5.
Darstellung der CRF-Aktivität (1) in Nachbarschaft von synaptischen Kontakten (2) einer Moosfaserrosette (4)

Bergmann-Gliazellen: Die dritte elektronenmikroskopisch auffällige neuronale Struktur ist die Bergmann-Gliazelle (5). Typisch ist für diese Zellreihe ein großer heller Kern mit reichlich Zytoplasma und Zellorganellen. Die Bergmann-Gliazelle befindet sich typischerweise in Umgebung der Purkinjezellen. Diese Zellreihe spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Körner- und Purkinjezellen.

Abb. 5.3-7 bis 5.3-10 zeigen die elektronenmikroskopischen Darstellungen von immunhistochemisch markierten Bergmann-Gliazellen. In Abb. 5.3-8 und 5.3-10 sind die markierten Strukturen im Zytoplasma, meist in Nachbarschaft von Vesikeln des Golgi-Apparates (1) und enzymatisch aktiver Zellorganellen zu finden.

5.3.1 Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse

Die elektronenmikroskopische Darstellung des Neurotransmitters CRF konnte die lichtmikroskopischen Resultate bestärken. Es wurden spezifisch sowohl Kletterfasern als auch Moosfaserosetten dargestellt. In beiden afferenten cerebellären Systemen konnte CRF elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Reaktionsprodukte waren in der Mehrzahl der Fälle in der Umgebung von synaptischen Vesikeln oder Zellfilamenten lokalisiert. Die synaptischen Kontakte befanden sich dabei meist in der Entwicklungsphase.

Als Besonderheit gilt die Darstellung der Bergmann-Gliazellen. Eine CRF-Aktivität konnte bei dieser Zellreihe erstmalig elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Hierbei wurden vor allem Reaktionsprodukte in Nachbarschaft von Zellorganellen immunhistochemisch dargestellt. Das Neuropeptid war meist in der Nachbarschaft von Vesikeln zu beobachten. Weitere Zellarten oder neuronale Strukturen wurden nicht spezifisch angefärbt.

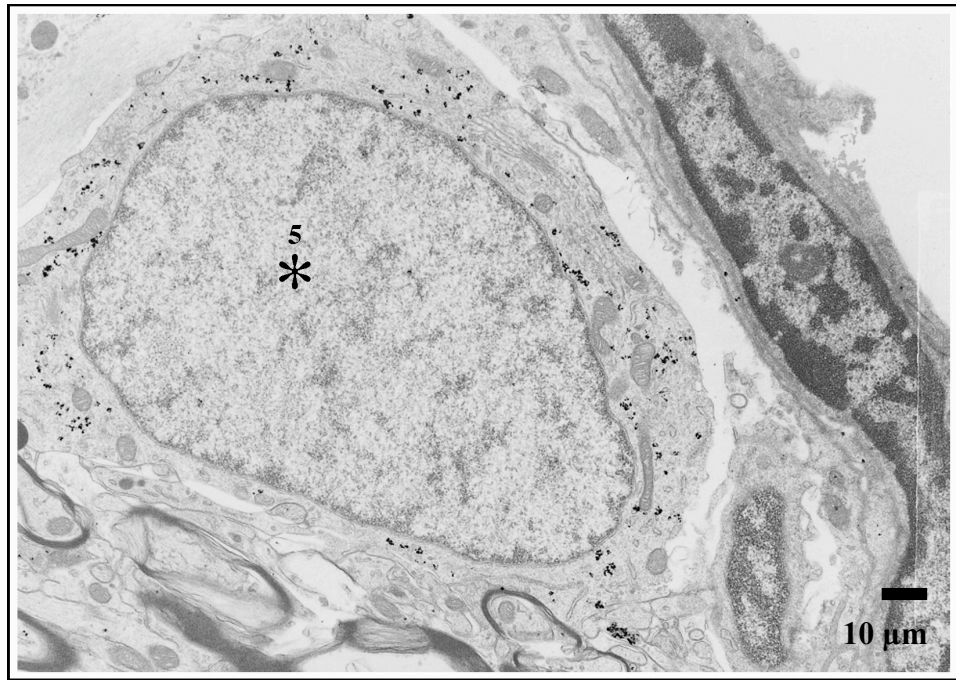


Abb. 5.3-7
Elektronenmikroskopische Darstellung einer Bergmann-Gliazelle (5) mit CRF-Aktivität an der Grenze zur Körnerzellschicht einer 15 Tage (PD 15) alten Ratte

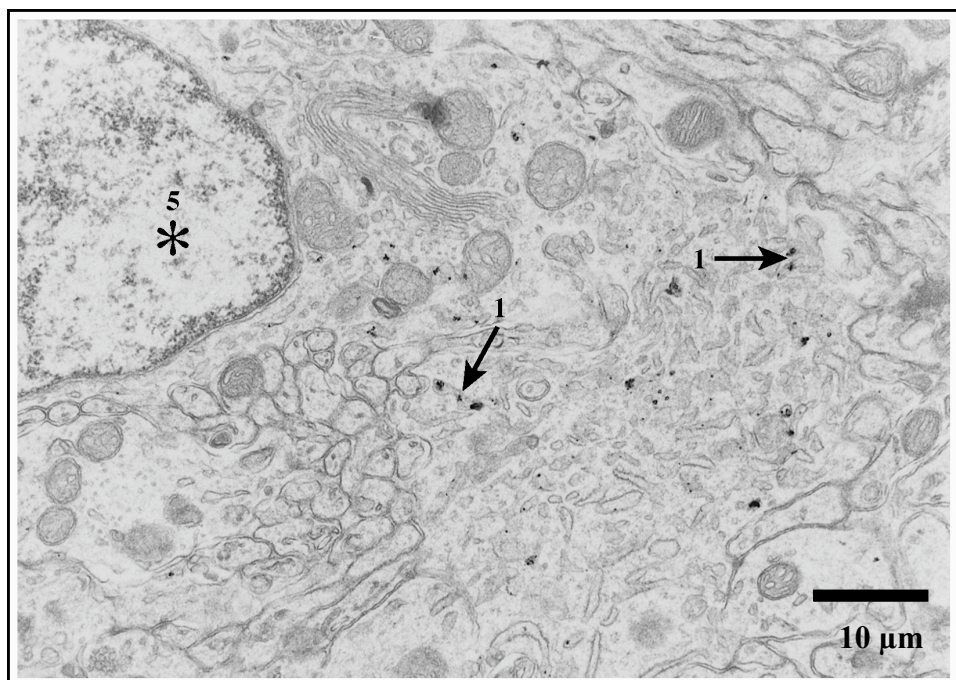


Abb. 5.3-8
Elektronenmikroskopische Darstellung einer Bergmann-Gliazelle (5) mit CRF-Aktivität (1) in der Molekularschicht einer 15 Tage (PD 15) alten Ratte

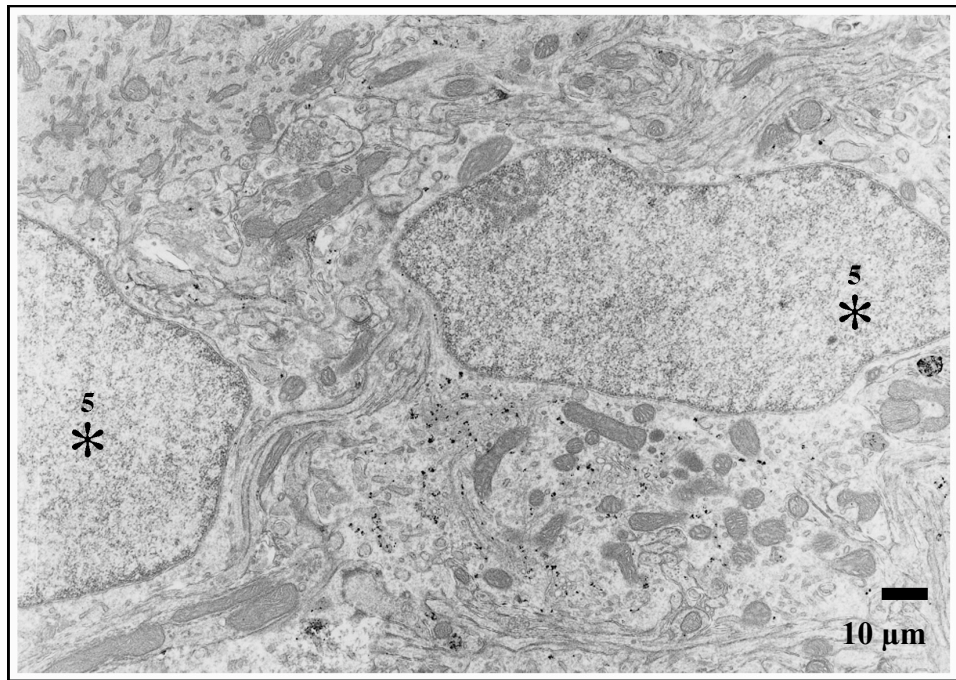


Abb. 5.3-9
Elektronenmikroskopische (EM) Darstellung von Bergmann-Gliazellen in der Molekularschicht einer 21 Tage (PD21) alten Ratte

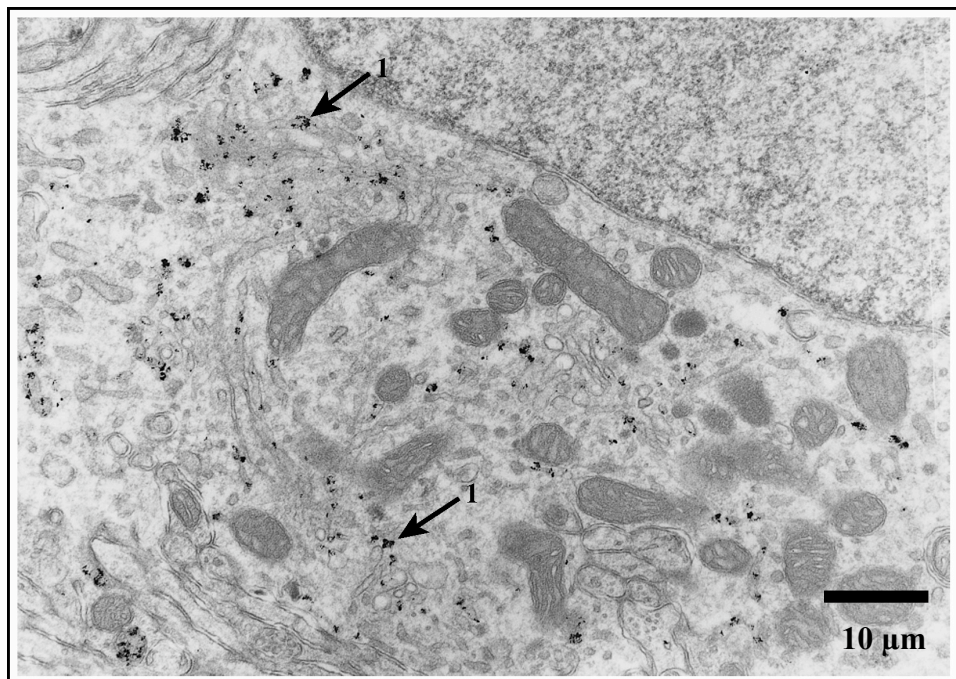


Abb. 5.3-10
Detailaufnahme der EM Darstellung von Abb. 5.3-9
CRF-Aktivität (1) im Zytoplasma einer Bergmann-Gliazelle

6 Diskussion

6.1 Immunhistochemische Lokalisation von CRF

Die Funktionen von CRF sind ausführlich im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden System untersucht worden (Klinke und Silbernagel 1996, Webster et al. 1998, Engler et al. 1999 sowie Stout et al. 2002). Dies gilt insbesondere für die physiologische Antwort auf Stressreaktionen mit Beteiligung des autonomen Nervensystems.

Diese wissenschaftliche Arbeit beschreibt die Lokalisation von CRF im Cerebellum der Wistar-Ratte. Hierbei sind die Strukturen des afferenten cerebellären Systems von besonderer Bedeutung. Kletterfasern, Moosfasern und ihre Varikositäten wurden bei verschiedenen Tierspezies, wie Beutelratten (Cummings et al. 1989 und Cummings et al. 1994), Schafen (Cummings et al. 1988), Mäusen (Yamamoto und Tohyama 1994, Overbeck und King 1999) und Ratten (van den Dungen et al. 1988), bereits immunhistochemisch dargestellt. Da die Ergebnisse dieser Experimente durchaus Übereinstimmungen aufweisen, könnten die Funktionen des Neuropeptides bei verschiedenen Säugetieren ähnlich sein.

In der vorliegenden Arbeit wird in Erweiterung früherer Befunde (Powers et al. 1987, Bishop und King 1999, Overbeck et al. 1999 und Bishop et al. 2000) erstmalig die Expression von CRF im Cerebellum während der postnatalen Entwicklung der Ratte mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen veranschaulicht. Die durchgeführten Studien im cerebellären Cortex sollen mögliche Erklärungsansätze der Rolle von CRF bei der Erlernung und Entwicklung von Motorik bieten. Alle Regionen des Cerebellums wurden licht- und elektronenmikroskopisch betrachtet. Dabei wurden Kletterfasern, Moosfasern und Bergmann-Gliazellen immunhistochemisch in unterschiedlichen postnatalen Stadien dargestellt.

Mit großer Wahrscheinlichkeit sind verschiedene Gebiete des Cerebellums zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien an beispielsweise pyramidalen und extrapyramidalen Bewegungen beteiligt. In dieser Arbeit wird versucht, ein globales Bild über die Aktivität des Cerebellums zu vermitteln, die Betrachtung von einzelnen cerebellären Gebieten steht hierbei nicht im Vordergrund.

Die Unterschiede in Lokalisation und Verteilung von CRF sind in bestimmten postnatalen Stadien deutlich nachzuweisen. Mit Preembedding-Methoden konnte CRF in einer Teilklasse der cerebellären Perikarya, insbesondere aber in den Varikositäten der Afferenzen von Moos- und Kletterfasern nachgewiesen werden.

Offenbar wird CRF in Neuronen der cerebellären Regelkreise, außerhalb der hypothalamischen neuroendokrinen Systeme, während der postnatalen Entwicklung exprimiert und axonal transportiert. CRF-positive Perikarya werden in den Olivenkernen gezeigt (Mezey und Palkovits 1991, Errico und Barmack 1993), in den Brückenkernen (Bishop 1998) sowie im Tractus spinocerebellaris (Cummings et al. 1988 und Cummings 1989). Die Rolle von CRF in diesen Systemen ist bisher unvollständig erforscht. Bishop (2002) vermutet unterschiedliche Funktionen von CRF bei der postnatalen Entwicklung und im adulten Cerebellum. Während der cerebellären Reifung scheint die Synaptogenese sensibel auf das Neuropeptid zu reagieren.

Diese Arbeit ermöglicht eine Analyse der Lokalisation der Reaktionsprodukte während der kritischen Phase des cerebellären Wachstums und der cerebellären Entwicklung. Mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Techniken kann die CRF-Verteilung genauer beschrieben werden.

6.1.1 Der cerebelläre Cortex

In der vorliegenden Arbeit wird CRF bei Wistar-Ratten unter Hinzunahme eines spezifischen Antikörpers (Peninsula IHC 8561) im postnatalen Cerebellum dargestellt. Dabei ist die Preembedding-Technik für licht- und elektronenmikroskopische Versuche nach den Protokollen B (2.2.2.1.1) und C (2.2.4.1.1) angewendet worden. Die Experimente zeigen in den lichtmikroskopischen Abb. 5.2-1 bis 5.2-14 eine charakteristische Darstellung von CRF-positiven Kletterfasern (1) und Moosfasern mit typischer Rosettenformung (2). Ebenso beschreiben Cummings et al. (1988) bei Katzen und Schafen CRF in Kletterfasern und Moosfasern innerhalb der Körnerzellschicht. Dabei erscheinen die Kletterfasern um die Purkinjezellsomata und folgen ihren Dendriten bis in die Molekularschicht.

Ähnliche Beobachtungen werden auf den Abb. 5.2-7 bis 5.2-10 lichtmikroskopisch dargestellt. Die Kletterfasern (1) sind hierbei in unmittelbarer Nachbarschaft der Somata von Purkinjezellen anzutreffen. Die Moosfasern sind durch ihre auffälligen Rosetten (2) in der Körnerzellschicht zu identifizieren (Abb. 5.2-10 und 5.2-12).

Cummings et al. (1988) beschreiben eine dritte Zellreihe, die ebenfalls CRF-positive Reaktionsprodukte aufweist. Diese Zellen sind im Stratum ganglionare nachzuweisen, in unmittelbarer Nachbarschaft von Purkinjezellsomata.

In den vorliegenden lichtmikroskopischen Experimenten konnten nur ansatzweise weitere Zellreihen mit CRF-Aktivität beobachtet werden. Deshalb wurde zur exakteren Darstellung die Elektronenmikroskopie verwendet. Mit detaillierten Aufnahmen konnten die Ergebnisse der Lichtmikroskopie bestätigt werden (Abb. 5.3-1 bis 5.3-6). Dabei wurde die Lokalisation der Reaktionsprodukte noch präziser bestimmt. Bei den elektronenmikroskopischen Experimenten hatten die Wistar-Ratten ein postnatales Alter von 15, 18 und 21 Tagen.

In den Kletterfasern (Abb. 5.3-1 und 5.3-2) wird das Neuropeptid elektronenmikroskopisch in zwei verschiedenen Positionen beobachtet. In Abb. 5.3-1 sind die Reaktionsprodukte (1) entlang der Mikrotubuli von Kletterfasern angeordnet. Es kann sich hierbei um ein Transportsystem handeln, wobei CRF mit Hilfe der Kletterfasern ausgehend von der unteren Olive in den cerebellären Cortex gelangt. Aus der Abb. 5.3-2 ist ersichtlich, dass CRF (1) in der Umgebung von synaptischen Vesikeln der Kletterfasern angeordnet ist. Hierbei befindet sich das Neuropeptid in runden Vesikeln mit enger Nachbarschaft zu synaptischen Kontakten, beispielsweise zu Purkinjezellen, nicht aber in den Synapsen selbst.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass CRF innerhalb der Kletterfasern eine mögliche Rolle als Neuromodulator einnimmt, zusätzlich zur klassischen Funktion als Neurotransmitter. Die potentielle Rolle von CRF als Neuromodulator beschreiben Bishop et al. (1990). In ihren Experimenten konnten sie nachweisen, dass das Neuropeptid CRF allein keine exzitatorische Aktivität an den Purkinjezellen besitzt. Eine interessante Beobachtung ist, dass CRF den Effekt von Glutamat als endogener Neurotransmitter bei exzitatorischer Purkinjezellaktivität potenzieren kann. Die Interaktion zwischen CRF-positiven Kletterfasern, in Verbindung mit dem glutamatreichen System und den beiden CRF-Rezeptoren (Miyata et al. 1999) ist entscheidend für LTD.

Cummings (1989) vermutet eine primäre Rolle von CRF bei der Signaltransduktion. Dies würde die Anwesenheit von Reaktionsprodukten in den präsynaptischen Terminalen erklären können.

Des Weiteren wurden elektronenmikroskopisch Moosfaserosetten (4) in der Körnerzellschicht dargestellt (Abb. 5.3-3 und 5.3-4). Dabei ist auffallend, dass die Reaktionsprodukte (1) in Abb. 5.3-5 und 5.3-6 nur in vereinzelten Rosetten nachzuweisen sind. Diese Beobachtung kann in einer möglichen spezifischen Funktion des Neuropeptides innerhalb der Moosfaserosetten begründet liegen. In den Abb. 5.3-4 und 5.3-6 sind die Moosfaserosetten mit Reaktionsprodukten im Detail deutlich abgebildet. Hierbei liegt die besondere Aufmerksamkeit in den synaptischen Kontakten der Rosetten. Das immunhistochemisch dargestellte Neuropeptid (1) befindet sich meist in Nachbarschaft der Synapsen und innerhalb rund geformter Vesikel. Diese Beobachtung bestärkt die Theorie Cummings (1989), dass CRF bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Auch in den Brückenkernen wurde CRF nachgewiesen (Merchenthaler et al. 1982 sowie Haas und George 1987). Wahrscheinlich enthalten die fronto- und temporopontinen Afferenzen des Cerebellums.

In den elektronenmikroskopischen Studien konnte eine weitere CRF-positive Zellreihe, die Bergmann-Gliazelle (5) nachgewiesen werden (Abb. 5.3-7 bis 5.3-10). Zur Identifizierung dieser Zellreihe wurden die Lehrbücher Altman und Bayer (1997) sowie Chan-Palay (1974) herangezogen. Die Bergmann-Gliazellen bestehen aus einem großen, chromatinarmen Zellkern und einem umfangreichen Zytoplasma. Die Reaktionsprodukte (1) befinden sich im Zytoplasma in Nachbarschaft von Vesikeln und Goli-Apparaten. Dies lässt vermuten, dass Bergmann-Gliazellen möglicherweise bei der Expression von CRF beteiligt sind. Cummings et al. (1988) beschreiben in der Umgebung von Purkinjezellen positiv angefärbte Zellen, die lichtmikroskopisch nicht exakt benannt wurden. Der Nachweis von CRF-mRNA in Gliazellen fehlt allerdings bisher. Möglicherweise nehmen die Bergmann-Gliazellen nur parakrin sezerniertes CRF, auf ohne es selbst zu exprimieren.

Die Beobachtung, dass Bergmann-Gliazellen ebenfalls eine CRF-Aktivität aufweisen, wurde elektronenmikroskopisch bisher nicht beschrieben. Die Rolle der Bergmann-Gliazellen bei der Aufnahme und dem Transport von CRF könnte mit Funktionen in den postnatalen Entwicklungsstadien im Zusammenhang stehen.

Bergmann-Gliazellen beeinflussen aktiv den Prozess der Migration von Körner- und Purkinjezellen (Reichenbach et al. 1995 sowie Komuro und Rakic 1998) und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Bildung eines Dendritenbaumes und seiner synaptischen Verbindungen (Muller und Kettenmann 1995). Es konnte belegt werden (Lafarga et al. 1998), dass Bergmann-Gliazellen innerhalb der Molekularschicht Leitstrukturen für die neuronale Differenzierung bilden.

6.1.2 Das afferente und efferente System

Das extrazelluläre Vorkommen von CRF ist in Verbindung mit Funktionen des Neuropeptides im cerebellären Cortex von großer Bedeutung. Im afferenten System der Katze (Cummings et al. 1989) und der Beutelratte (Cummings et al. 1988 und Cummings 1989) wurde CRF in der unteren Olive, den Ursprung der Kletterfasern, und im Hirnstamm (Cummings et al. 1988 und Cummings 1989), Ausgangspunkt der Moosfasern, immunhistochemisch nachgewiesen. Außerdem konnten CRF-positive Reaktionsprodukte in den Kleinhirnkernen (Cummings et al. 1988) dargestellt werden. Aus diesen Untersuchungsergebnissen lässt sich ableiten, dass CRF im afferenten und im efferenten System präsent ist.

Powers et al. (1987) konnten CRF im humanen olivocerebellären Kreislauf nachweisen. Es ist anzunehmen, dass das Neuropeptid während der Entwicklung zusätzliche Funktionen übernehmen könnte.

Zum besseren Verständnis der entwicklungsspezifischen Vorgänge eignet sich besonders die Wistar-Ratte als Versuchstier, da bei ihr, ebenso wie bei dem humanen Cerebellum, die cerebelläre Entwicklung bei der Geburt noch nicht abgeschlossen ist. Das Cerebellum ist das wichtigste Koordinationszentrum der willkürlichen Motorik, wobei Moos- und Kletterfasern zu den Kollateralen prämotorischer pyramidalen und spinocerebellärer Afferenzen zählen. Es fällt auf, dass in einer kritischen Phase der motorischen Entwicklung, zwischen dem zwölften und fünfzehnten postnatalen Tag, CRF im Cerebellum verstärkt exprimiert wird. Möglicherweise hat CRF in dieser Phase Bedeutung als trophischer Faktor.

Die Expression des Neuropeptides im postnatalen Stadium ist umstritten. Die Afferenzen des Cerebellums weisen CRF auf. Es bestehen jedoch Zweifel, ob die alleinige Expression des Neuropeptides im afferenten System ausreichend ist oder weitere Transportwege bestehen.

6.2 CRF während der Entwicklung

Die vorliegenden Experimente beschreiben den cerebellären Cortex der Wistar-Ratte mit dem dritten postnatalen Tag (PD 3). Zu diesem Zeitpunkt werden lichtmikroskopisch vereinzelt neuronale Strukturen in der Körnerzellschicht des Cortex mit einem CRF Antikörper angefärbt (Abb. 5.2-15 und 5.2-15a). Die Molekular- und die Purkinjezellschicht bleiben ausgespart. Die Anzahl der gefärbten Zellen in der Körnerzellschicht nimmt mit PD 6 (Abb. 5.2-16 und 5.2-16a) bis PD 9 (Abb. 5.2-17 und 5.2-17a) kontinuierlich zu. Am 12. postnatalen Tag (PD 12) überwiegen die immunhistochemisch dargestellten Elemente in der Purkinjezellschicht (Abb. 5.2-18 und 5.2-18a). Die CRF-positiven Fasern umschlingen die Somata der Purkinjezellen und bilden Ausläufer bis in die Molekularschicht. Diese Beobachtungen lassen erkennen, dass das Neuropeptid CRF in der frühen postnatalen Phase kontinuierlich und mit steigender Zellzahl im cerebellären Cortex gehäuft auftritt.

Dies wird durch die Untersuchungen von van den Dungen et al. (1988) an Ratten bestätigt. Hierbei wurde mit PD 8 ein Anstieg der CRF-positiven Faseranteile beobachtet. Das dabei dargestellte Fasersystem umschlingt mit PD 12 korbähnlich die Somata der Purkinjezellen. Im Cerebellum der Maus machten Overbeck und King (1999) ähnliche Beobachtungen. Sie beschreiben ab PD 3 das erste Auftreten von CRF-positiven Immunfärbungen im cerebellären Cortex. In einem kurzen Zeitraum, zwischen PD 3 und PD 7, gruppieren sich bei diesen Experimenten (Overbeck und King 1999) umschriebene CRF-positive Varikositäten um die Somata der Purkinjezellen.

Yamano und Tohyama (1994) zeigen in ihren Versuchen mit Mäusen intensiv dargestellte Fasersysteme, welche ebenfalls ab PD 7 synaptische Kontakte mit Somata der Purkinjezellen bilden.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit werden durch die Experimente von van den Dungen et al. (1988), Overbeck und King (1999) sowie Yamano und Tohyama (1994) unterstützt.

Die Veränderungen während der Entwicklung sind bei zahlreichen Spezies ähnlich, jedoch unterscheidet sich die zeitliche Abfolge der einzelnen CRF-aktiven Perioden.

Mit PD 15 werden in dieser Arbeit alle afferenten Fasersysteme des cerebellären Cortex immunhistochemisch dargestellt (Abb. 5.2-19 und 5.2-19a). Die Anzahl der Reaktionsprodukte verringert sich beginnend mit PD 15 langsam weiter mit zunehmendem Lebensalter, was die Untersuchungsergebnisse von PD 30 (Abb. 5.2-20 und 5.2-20a) und PD 40 (Abb. 5.2-21 und 5.2-21a) besonders veranschaulichen. Die Existenz von CRF im afferenten System des Cerebellums wird in einer Vielzahl von Studien bestätigt.

Cummings et al. (1988) und Ha et al. (2000) beschreiben eine weitere unspezifische CRF-positive Zellpopulation in Nachbarschaft der Purkinjezellschicht, welche die Somata der Purkinjezellen umschlingen.

Auf elektronenmikroskopischem Niveau wurden die Afferenzen des Cortex, wie Kletterfasern (Abb. 5.3-1 und 5.3-2) und Moosfasern (Abb. 5.3-3 bis 5.3-6), immunhistochemisch dargestellt. Außerdem wurde CRF im Zytoplasma der Bergmann-Gliazellen (Palay und Chan-Palay 1974) elektronenmikroskopisch (Abb. 5.3-7 bis 5.3-10) nachgewiesen. Diese Ergebnisse unterstützen möglicherweise die lichtmikroskopischen Beobachtungen von Cummings et al. (1988) und Ha et al. (2000). In ihren Experimenten scheint die CRF-positive Zellpopulation mit der Bergmann-Gliazelle übereinzustimmen, jedoch ist die Identifizierung dieser Zellreihe auf elektronenmikroskopischem Niveau einfacher. Die Rolle der Bergmann-Gliazelle, eine Radiärglia, ist wichtig für die synaptische Plastizität in der Molekularschicht.

Aus den vorgestellten Untersuchungen wird ersichtlich, dass CRF in steigendem Maß postnatal bis zum 15. Lebenstag nachzuweisen ist. In dieser Phase entwickelt sich das Cerebellum der Wistar-Ratte besonders stark. Die Tiere öffnen ihre Augen und beginnen die Motorik zu trainieren. Mit einem Alter von 30 oder 40 Tagen sind diese Prozesse bei Ratten bereits abgeschlossen, so dass möglicherweise die Abnahme der CRF-Konzentration in den Fasersystemen hiermit korreliert.

Die Beobachtungen der vorliegenden lichtmikroskopischen Experimente zeigen eine deutliche Konzentrationsverschiebung der Reaktionsprodukte in der Periode PD 3 bis PD 15. Hierbei sind die Reaktionsprodukte bis PD 9 in der Körnerzellschicht zu erkennen. Am 12. postnatalen Tag erscheinen die immunhistochemisch dargestellten Elemente in überwiegender Anzahl in der Purkinjezellschicht. An den postnatalen Tagen PD 15, 30 und 40 sind die Reaktionsprodukte hauptsächlich in der Molekular- und Körnerzellschicht nachzuweisen. Möglicherweise finden in diesen Stadien besonders innerhalb der Molekular- und Körnerzellschicht synaptische

Entwicklungen statt. Bei der Ausbildung von synaptischen Bahnen, ist Effizienz ein entscheidender Faktor. Durch schnell Signalübertragung kann die Reaktionsfähigkeit erhöht werden (Lacoboni 2001). Dies ist die Basis der Lernvorgänge.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen CRF-Verteilungen wäre das Wachstum der CRF-positiv dargestellten Fasern. Die Kletterfasern, welche ihren Ursprung aus der Olive nehmen, müssen „ihren Weg“ in die Molekularschicht noch finden. Dabei werden sie durch Bergmann-Gliazellen geleitet. In frühen postnatalen Stadien sind die afferenten Elemente noch unvollständig entwickelt, erst im Laufe ihrer Entwicklung nehmen die Zellen und Fasersysteme an Größe zu. Damit vergrößern sich indirekt die nachweisbaren Reaktionsprodukte diesen Systemen.

CRF zeigt sich elektronenmikroskopisch in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen innerhalb des afferenten Systems. Interessant ist, dass die Reaktionsprodukte entlang von Mikrotubuli innerhalb der Kletterfasern (Abb. 5.3-1) transportiert oder in runden präsynaptischen Vesikeln der Moosfaserosetten (Abb. 5.3-4) bereitgestellt werden. Ob Gliazellen selbst CRF exprimieren oder es von Nervenzellen aufnehmen, müssen weitere Arbeiten mit in-situ Hybridisierung zeigen. Mit den vorliegenden Beobachtungen wird deutlich, dass CRF mit Hilfe des afferenten Systems die Aktivität der Purkinjezellen moduliert könnte (Bishop et al. 2000). Dabei spielen wahrscheinlich die CRF-Rezeptoren vom Typ 1 und Typ 2 eine elementare Rolle.

6.3 Die CRF-Rezeptoren

Bislang sind zwei CRF-Rezeptortypen beschrieben (Chalmers et al. 1996, Baram et al. 1997). King et al. (1997) sowie King und Bishop (2002) weisen den CRF-Rezeptor Typ 1 in Purkinjezellen und innerhalb der Körnerzellschicht nach. Ein Einfluss von CRF auf die Aktivität der Purkinjezellen ist somit wahrscheinlich.

Außerdem beeinflusst CRF in Verbindung mit seinem Rezeptor Typ 1 postnatal die Regulation der Entwicklung der cerebellären Neurone und der Gliazellen (King und Bishop 2002). Die Experimente von Bishop et al. (2000) beschreiben das Auftreten des Typ 1 Rezeptors in Somata der Purkinjezellen sowie in ihren primären Dendriten. Der zweite Rezeptortyp findet sich ebenfalls in Purkinjezellen der Molekularschicht. Bishop et al. (2000) finden den Rezeptor Typ 2 in Golgi-, Korb- und Sternzellen. Sie vermuten eine zellspezifische Ligand-Rezeptor Interaktion, sowie die Möglichkeit,

dass CRF die Aktivität von Neuronen, Axonen und Gliazellen modulieren könnte. Diese Hypothese kann möglicherweise einen wichtigen Schritt bei der Erforschung der cerebellären Entwicklung darstellen.

CRF und seine Rezeptoren (King und Bishop 2002) erfüllen während der frühen postnatalen Entwicklungsphasen im Cerebellum unterschiedliche Funktionen. Vor allem die Steuerung der synaptischen Entwicklung steht hierbei im Mittelpunkt. CRF und seine Rezeptoren spielen möglicherweise bei der Reifung des Purkinjezellendriten und seiner synaptischen Kontakte eine entscheidende Rolle (Swinny et al. 2003a und Swinny et al. 2003b). Somit kann die Entwicklung verschiedener cerebellärer Strukturen mit einander korreliert werden. Es besteht die Möglichkeit (Bishop 2002), dass sich bestimmte biochemische Eigenschaften des CRF-Rezeptors während der Entwicklungsphase ändern und somit unterschiedliche Funktionen ausgeführt werden könnten.

Beide Rezeptoren reagieren durch Aktivierung eines G-Proteins. Dieses koppelt an Adenylatcyclase, welche aktivierend auf einen second messenger, die Protein Kinase C (PKC), wirkt (Bishop et al. 2000). CRF reagiert ebenfalls über eine PKC.

Eine gestörte Aktivierung der CRF-Rezeptoren wurde bei Stress assoziierten Erkrankungen, wie Angststörungen und Depression, nachgewiesen (Dautzenberg und Hauger 2002). Mit Blockierung des Typ 1 Rezeptors wurden neue Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankungen gefunden.

Der CRF 1 Rezeptor (Bishop et al. 2000) wird außerdem innerhalb von radiär verlaufenden Strukturen in der Molekularschicht nachgewiesen. Diese dargestellten Strukturen sind mit großer Wahrscheinlichkeit Radiärglia, Bergmann-Gliazellen. Somit scheint auch diese Zellreihe auf das Neuropeptid CRF reagieren zu können. Bisher (Yamada et al. 2000, Riquelme et al. 2002) wurde angenommen, dass die Bergmann-Glia über Glutamat Rezeptoren den Input der Purkinjezellen beeinflusst. Hierbei sind vor allem die synaptische Entwicklung und Neuronendegenerationen erforscht worden. Mit Hilfe der CRF-Rezeptoren Darstellung innerhalb der Bergmann-Gliazellen sind die Funktionen dieser Zellreihe vielleicht besser zu erklären.

Die CRF-Rezeptortypen 1 und 2 erscheinen in unterschiedlichen Lokalisationen im Cortex. Dies kann weiterhin auf mögliche Funktionsunterschiede hinweisen.

Urocortin, ein Peptid der CRF Familie (Lewis et al. 2001), kann ebenfalls die CRF-Rezeptoren aktivieren. Hierbei reagiert Urocortin wahrscheinlich als Cofaktor (Swinny et al. 2002) bei cerebellären Prozessen.

6.4 Methodische Aspekte

Für die licht- und elektronenmikroskopischen Darstellungen der CRF Immunfärbung im postnatalen cerebellären Cortex der Wistar-Ratte wurde mit verschiedenen Methoden gearbeitet. Das Ziel war eine Kombination aus gut darstellbarer Morphologie und ausreichender Antigenerhaltung, die licht- und elektronenmikroskopisch zu beobachten ist. Die Preembedding-Technik erwies sich gegenüber der Postembedding-Technik als vorteilhaft. Es konnten mit relativ geringem Aufwand große Gebiete im Cerebellum bearbeitet werden. Außerdem ließ sich die Preembedding-Technik sowohl in der Licht- als auch in der Elektronenmikroskopie anwenden.

Das Material musste zuerst ausreichend fixiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Aktivität der Antigene bei milder Fixierung wesentlich besser erhalten bleibt. Eine zu starke Fixierungsmethode führt allerdings zu schlechter Strukturhaltung.

Zu Beginn der Experimente wurde außerdem mit zwei verschiedenen Perfusionslösungen (2.2.1.1.1) gearbeitet. Diese sind in Protokoll A dargestellt. Bei Verwendung der Perfusionslösung A (Dr. van der Want: Persönliche Mitteilung, 1999) wurde eine gute Morphologie erzielt, jedoch zu Ungunsten der Antigenerhaltung. In Anlehnung an die von King et al. (1997) und Yamano et al. (1994) entwickelten Fixierungsmethoden wurde eine Kombination, Perfusionslösung B, gewählt. Hierbei entsprach die Morphologie und Antigenität im cerebellären Cortex den Erwartungen. In dieser Arbeit sollte eine Fixierungsmethode gefunden werden, die bei licht- und elektronenmikroskopischen Experimenten angewendet werden konnte, da somit ein Vergleich der Reaktionsprodukte möglich ist.

Der zweite experimentelle Schritt war ein Vergleich der standardisierten Nachfixierung mit Osmium (Nunes Cardozo und van der Want 1990, Rossi et al. 1991 und Yamano et al. 1994) mit der Methode nach Phend (Phend et al. 1995). Ziel dieser Experimente war ein neues Verfahren der Nachfixierung zu entwickeln, ohne die Verwendung des toxischen Osmiums. Die elektronenmikroskopischen Resultate unter Hinzunahme der Phend-Methode sollten eine vergleichbare Qualität aufweisen.

Es zeigte sich, dass die Phend-Technik elektronenmikroskopisch keine optimale Morphologie ergab und die Spezifität der Reaktionen fragwürdig war. Es konnten aufgrund der Schäden im Gewebe keine spezifischen Zellanteile dargestellt werden, weshalb in den weiteren Experimenten dieser Arbeit mit der Perfusionslösung B und dem standardisierten Osmium-Verfahren zur Nachfixierung gearbeitet wurde.

Bei der Beurteilung der immunhistochemischen Resultate treten ebenfalls falsch positive und falsch negative Ergebnisse auf. Die lichtmikroskopische Darstellung der Purkinjellsomata ist ein Beispiel für eine falsch positive Reaktion. Hierbei ist die Darstellung der Zellen ein Artefakt der Präparation. Die Anfärbung unterscheidet sich von den CRF-positiven Reaktionsprodukten, welche in Faseranteilen und Varikositäten anzutreffen sind. Hierbei dominieren scharf begrenzte Strukturen, die in den elektronenmikroskopischen Präparaten und in den lichtmikroskopischen Kontrollen zu finden sind. Die Somata der Purkinjellen weisen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine endogene Aktivität für Peroxidase auf (Dr. Han van der Want: persönliche Mitteilung, 1999).

Eine enzymatische Reaktion wird auch innerhalb der GSSP-Procedure (4.2.4.1.1) genutzt. Hierbei werden durch eine Photoreaktion mit Goldchloriden die Reaktionsprodukte auch elektronenmikroskopisch sichtbar. Die unscharfe Anfärbung der Kerne von Purkinjellen kann hierbei eine Erklärung für dieses Phänomen sein. Bei den vorliegenden Experimenten wurden zur Kontrolle der Ergebnisse auch Antikörper gegen CGRP und VDR im cerebellären Cortex verwendet. Bei diesen Experimenten waren die Purkinjellsomata ebenfalls unspezifisch dargestellt. Dies spricht dafür, dass bei entsprechender zellulärer Aktivität unspezifische Reaktionen auftreten können.

6.5 CRF als neuroaktives Peptid

In-vitro-Studien von Bishop und King (1992) zeigen bei Erhöhung der CRF-Konzentration eine Stimulation der Purkinjellen. Es wird vermutet, dass CRF über synaptische Kontakte des afferenten Fasersystem des cerebellären Cortex die Aktivität der Purkinjellen beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich CRF licht- und elektronenmikroskopisch in Kletter- und Moosfasern in unterschiedlicher Konzentration sowie in Bergmann-Gliazellen. Die Dynamik zwischen dem afferenten System sowie der einzigen Efferenz des Cortex, den Purkinjellen, ist besonders in

der postnatalen Phase von Bedeutung. Hierbei bestimmen die Erregungen von synaptischen Kontakten die Entwicklung der Fasersysteme. Die CRF-Rezeptoren spielen hierbei eine ebenso wichtige Rolle wie das Neuropeptid selbst. Es ist anzunehmen, dass die Lokalisation von CRF im cerebellären Cortex mit dem Vorkommen seiner Rezeptoren korreliert. Die zwei bekannten Rezeptorentyp 1 und 2 werden in unterschiedlichen Lokalisationen (Bishop et al. 2000) im Cerebellum (Potter et al. 1994 und Lovenberg et al. 1995) dargestellt. Das Zusammenspiel aus CRF und seinen Rezeptoren kann möglicherweise cerebelläre Funktionen beeinflussen. Hinweise hierfür liefern Studien an “knock-out” Mäusen. Bei diesen Tieren wurde der CRF-Rezeptor Typ 2 spezifisch ausgeschaltet, was Störungen in der Motorik (Kishimoto et al. 2000) und im Verhalten (Bale et al. 2000) zur Folge hatte. Diese Untersuchungen bestärkten die Theorie, dass eine fehlerhafte Interaktion des Neuropeptides CRF mit seinen Rezeptoren Störungen in cerebellären Funktionen verursacht.

Die Funktionen von CRF im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System in Beziehung zu Stress sind bekannt (Spiess et al. 1981, Vale et al. 1981, Klink und Silbernagel 1996). Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass CRF vermutlich in beträchtlichem Umfang die postnatale cerebelläre Entwicklung beeinflusst. Offenbar sind die cerebellären Funktionen unabhängig von der hypothalamischen CRF Expression. Bisher sind keine Afferenzen bekannt, die auf eine Verbindung hinweisen.

Miyata et al. (1999) belegen in ihren Studien an Ratten, dass CRF bei der Induktion von LTD beteiligt ist. Dafür wurde der CRF-Rezeptor Typ 1, welcher nachweislich in Purkinje- und Körnerzellen auftritt, spezifisch mit sogenannten α -helical CRF und mit Astressin blockiert. Nach der Blockierung des Rezeptors, und somit der CRF Wirkung, konnten LTD in Kletterfasern nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung änderte sich bei Beendigung der Rezeptorblockierung (Bishop und King 1999).

Overbeck und King (1999) vermuten eine zentrale Rolle von CRF bei cerebellären Entwicklungsprozessen. Ihre Theorien basieren auf Erkenntnissen bei adulten Ratten. Wobei CRF als möglicher Neuromodulator beschrieben wird (Cummings et al. 1994, King et al. 1997, Overbeck und King 1999). Hierbei könnte CRF außerdem als Auslöser für neuronales Wachstum fungieren (Cibelli et al. 2001).

Eine Hypothese zur Erklärung von Lernprozessen auf synaptischer Ebene ist die Marr-Albus-Ito Theorie (Ito 1982, Blond und Crépel 1996). Diese besagt, dass LTD einen essentiellen Mechanismus zur Erlernung von Motorik darstellt. Miyata et al. (1999) vermuten, dass CRF auch die Induktion von LTD zwischen synaptischen Kontakten der Parallelfasern mit den Purkinjezellspines beeinflusst. Des weiteren wurde die Bildung von LTD in Kletter- (Hansel et al. 2000) und Parallelfasern (Daniel et al. 1998) beschrieben. LTD führt möglicherweise zu einer Umwandlung von multipler zu einfacher Innervation zwischen Kletter- und Purkinjezellen (Hansel et al. 2000). Damit stimuliert LTD synaptische Kontakte im Cerebellum und somit die synaptische Plastizität. Hierdurch werden Lernvorgänge ermöglicht (Blank et al. 2002).

In den vorliegenden Experimenten zeigt sich eine unregelmäßige CRF-Verteilung im Cortex. Besonders deutlich sind mit PD 15, 30 und 40 in den Abb. 5.2-9, 5.2-11 und 5.2-13 die Reaktionsprodukte in territorialer Ausrichtung im Cortex zu erkennen. Die CRF-Verteilung ist hierbei in allen Schichten des Cortex säulenartig angeordnet.

Diese Beobachtungen deuten auf Funktionsunterschiede innerhalb des Cortex hin. Die ungleiche Lokalisation der Reaktionsprodukte im cerebellären Cortex lässt schlussfolgern, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur bestimmte Bezirke im Lernprozess einbezogen sind. Bei Menschen und Ratten ist die Entwicklung der Haltungskontrolle ein limitierender Faktor bei der Herausbildung der Motorik (Gramsbergen 2001). Bei Ratten korreliert die Entwicklung der Motorik mit hoher Aktivität im Cerebellum (Geisler et al. 2000). Mit PD 6 beherrschen die meisten Ratten bereits einen Teil ihrer Motorik. Sie beginnen in dieser Zeit frei zu laufen. Im Cerebellum lässt sich zwischen PD 3 und PD 6 bereits eine erhöhte afferente Aktivität nachweisen. Diese Signale müssen verarbeitet und weitergeleitet werden. Kurz zuvor, um PD 6, öffnen die jungen Ratten die Augen. Dies ist in Abstimmung mit der Motorik sehr wichtig, denn über das optische System wird die Ausführung von Bewegungen zu einem großen Teil kontrolliert (Shibuki et al. 1996).

Der morphologische Aufbau des Cerebellums ähnelt mit PD 21 dem einer adulten Ratte und ist somit abgeschlossen. Das Muttertier verjagt ihre Jungen mit PD 21 und wendet sich einem neuen Wurf zu, denn die Tragezeit beträgt ebenfalls 21 Tage. Geschlechtsreif werden die Tiere mit 30 Tagen (Prof. Dr. Jirikowski: Persönliche Mitteilung, 1999).

CRF ist ein trophischer Faktor im cerebellären Cortex. Das Neuropeptid spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Cerebellums, da es wahrscheinlich für die Auslösung von LTD essentiell ist. CRF wird im afferenten System des postnatalen Cerebellums nachgewiesen. Die Konzentration des Neuropeptides unterscheidet sich in verschiedenen zeitlichen Entwicklungsstadien. Die Entwicklung von Motorik und das Öffnen der Augen zeigt hierbei eine deutliche Übereinstimmung. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Augenbewegungen und der Auslösung von LTD. Somit sind äußere Veränderungen und Reaktionen mit dem physiologischen Prozess LTD verbunden. Außerdem ist CRF wahrscheinlich ein Trigger für das Wachstum von Neuriten. Dies kann eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das postnatale Vorkommen von CRF sein.

Die Bergmann-Gliazelle nimmt indirekt Einfluss auf die cerebelläre Entwicklung, da sie die Wanderungen von Purkinje- und Körnerzellen aus der extrazellulären Schicht koordiniert. Der Nachweis von CRF innerhalb der Bergmann-Gliazellen könnte auf eine besondere Bedeutung des Neuropeptides bei der cerebellären Entwicklung hinweisen. Die Kommunikation zwischen Bergmann-Gliazellen und Purkinjezellen während der Auslösung und Aufrechterhaltung von LTD wird möglicherweise ebenfalls durch CRF moduliert.

CRF kann über seinen Rezeptor Typ 1, der in Bergmann-Gliazellen nachgewiesen wurde, verschiedene cerebelläre Funktionen steuern. Somit ist das Neuropeptid bei unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien auch ein essentieller glialer Faktor.

Die vorgelegte Arbeit belegt eine deutliche Veränderung der Verteilung von CRF im cerebellären Cortex während der postnatalen Entwicklung. Es wird versucht, eine Beziehung des Neuropeptides CRF mit Erlernung von Motorik und dem Öffnen der Augen durch vermehrte motorische Aktivität aufzuweisen. Dies ist unter anderem eine Voraussetzung für junge Tiere, um das Nest verlassen zu können.

LTD blockiert spezifische synaptische Übertragungen. Dies ermöglicht wahrscheinlich Trainingsprozesse innerhalb des Cerebellums. Durch häufige Nutzung von bestimmten synaptischen Bahnen wird es vielleicht möglich, dass diese Erregungen effizienter weitergeleitet werden. Der Körper hat somit die Möglichkeit seine Reaktionsfähigkeit der Umgebung anzupassen. Durch die synaptische Plastizität werden cerebelläre Lernvorgänge erst ermöglicht. CRF, seine Rezeptoren sowie LTD sind wichtige Faktoren beim Wachstum von Purkinjezeldendriten sowie der Entwicklung und Ausreifung von synaptischen Kontakten. Basierend auf mehrfach wiederkehrende Erregungsvorgänge kann synaptische Plastizität auf Lernvorgänge physischer und psychischer Art ausgedehnt werden. Damit ist die Darstellung von CRF im cerebellären Cortex ein Modellbeispiel für Lernvorgänge.

Die zeitliche Lokalisation und Konzentration von CRF im Cerebellum ist sehr unterschiedlich. Möglicherweise wird dies durch die spezifische Entwicklung des Cerebellums hervorgerufen. Hierbei sind Unterschiede in verschiedenen Spezies vorstellbar. Die Reihenfolge der cerebellären Entwicklungsphasen ist mit zeitlichen Unterschieden in allen Säugetieren ähnlich.

Diese Arbeit stellt ein Modellbeispiel für die postnatale cerebelläre Entwicklung auf, die durchaus auf den Menschen übertragen werden könnte. Das Verständnis von natürlichen Entwicklungsprozessen ermöglicht bei cerebellären Erkrankungen die Erkennung von Ursachen und deren effektive Bekämpfung.

Eine abnormale Signalfolge der CRF-Rezeptoren Typ 1 und 2 kann zur Pathophysiologie von Stress-assoziierten Erkrankungen, wie Angststörungen und Depression, beitragen. Eine spezifische Blockierung des CRF-Rezeptors Typ 1 kann eine neue Behandlungsmöglichkeit von psychischen und neurologischen Erkrankungen darstellen.

Auch bei cerebellären motorischen Erkrankungen, wie beispielsweise der cerebellären Ataxie könnten möglicherweise ähnliche Strategien genutzt und neue Therapien entwickelt werden.

Altman J, Bayer SA: Development of the cerebellar system. In relation to its evolution, structure and functions. CRC Press. Boca Raton, New York London Tokyo (1997) S. 82-98, 324-334, 498-524

Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000)

Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410-414

Baram TZ, Chalmers DT, Chen C, Koutsoukos Y, De Souza EB (1997)

The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin-releasing factor (CRF) in the developing rat brain: in vivo evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. *Brain Res* 770: 89-95

Bishop GA, King JS (1992)

Differential modulation of Purkinje cell activity by enkephalin and corticotropin releasing factor. *Neuropeptides* 22: 167-174

Bishop GA (1998)

Brainstem origin of corticotropin-releasing factor afferents to the nucleus interpositus anterior of the rat. *J Chem Neuroanat* 15: 143-153

Bishop GA, King JS (1999)

Corticotropin releasing factor in the embryonic mouse cerebellum. *Exp Neurol* 160: 489-499

Bishop GA, Seelandt CM, King JS (2000)

Cellular localization of corticotropin releasing factor receptors in the adult mouse cerebellum. *Neurosci* 101: 1083-1092

Bishop (2002)

Development of a corticotropin-releasing factor-mediated effect on the firing rate of Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *Experimental Neurology* 178: 165-174

Blank T, Nijholt I, Eckart K, Spiess J (2002)

Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* 22: 3788-3794

Blond O, Crépel F (1996)

Cerebellar long-term depression. *TINS* 19: 11-12

Blond O, Daniel H, Otani S, Jaillard D, Crépel F (1997)

Presynaptic and postsynaptic effects of nitric oxide donors at synapses between parallel fibres and Purkinje cells: involvement in cerebellar long-term depression. *Neurosci* 77: 945-954

Cha CI, Foote SL (1988)

Corticotropin-releasing factor in olivocerebellar climbing-fiber system of monkey (*Saimiri sciureus* and *Macaca fascicularis*): parasagittal and regional organization visualized by immunohistochemistry. *J Neurosci* 8: 4121-4137

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB (1995)

Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15: 6340-6350

Chalmers DT, Lovenberg TW, Grigoriadis DE, Behan DP, De Souza EB (1996)

Corticotropin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends pharmac Sci* 17: 166-172

Cibelli G, Corsi P, Diana G, Vitiello F, Thiel G (2001)

Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized neuron via cAMP and MAP kinase signalling pathways. *Eur J Neurosci* 13: 1339-1348

Cummings SL, Elde R, Ells J, Lindall A (1983)

Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 3: 1355-1368

Cummings S, Sharp B, Elde R (1988)

Corticotropin-releasing factor in cerebellar afferent systems: a combined immunohistochemistry and retrograde transport study. *J Neurosci* 8: 543-554

Cumming SL (1989)

Distribution of corticotropin-releasing factor in the cerebellum and precerebellar nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 289: 657-675

Cummings SL, Young WS 3d, Bishop GA, De Souza EB, King JS (1989)

Distribution of corticotropin-releasing factor in the cerebellum and precerebellar nuclei of the opossum: a study utilizing immunohistochemistry, in situ hybridization histochemistry, and receptor autoradiography. *J Comp Neurol* 280: 501-521

Cummings SL, Young WS, King JS (1994)

Early development of cerebellar afferent systems that contain corticotropin-releasing factor. *J Comp Neurol* 350: 534-549

Daniel H, Levenes C, Crépel F (1998)

Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *TINS* 21: 401-406

Dautzenberg FM, Hauger RL (2002)

The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23: 71-77

De Souza EB (1995)

Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A (2000)

Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods* 96: 89-96

Dungen HM van den, Groenewegen HJ, Tilders FJ, Schoemaker J (1988)

Immunoreactive corticotropin releasing factor in adult and developing rat cerebellum: its presence in climbing and mossy fibres. *J Chem Neuroanat* 1: 339-349

Engler D, Redei E, Kola I (1999)

The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis. *Endocr Rev* 20: 460-500

Errico P, Barmack NH (1993)

Origins of cerebellar mossy and climbing fibers immunoreactive for corticotropin-releasing factor in the rabbit. *J Comp Neurol* 336: 307-320

Geisler HC, IJkema-Paassen J, Westerga J, Gramsbergen A (2000)

Vestibular deprivation and the development of dendrite bundles in the rat. *Neural Plast* 7: 193-203

Gramsbergen A (2001)

Normal and abnormal development of motor behavior: lessons from experiments in rats *Neural Plast* 8: 17-29

Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999)

Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann-Glial cells. *Nat Neurosci* 2: 139-143

Ha BK, Bishop GA, King JS, Burry RW (2000)

Corticotropin releasing factor induces proliferation of cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res* 62: 789-798

Haas DA, George SR (1987)

Neuropeptide Y administration acutely increases hypothalamic corticotropin-releasing factor immunoreactivity: lack of effect in other rat brain regions. *Life Sci* 41: 2725-2731

Hansel C, Linden DJ (2000)

Long-term depression of the cerebellar climbing fiber-Purkinje neuron synapse. *Neuron* 26: 473-82

Harrison SMW, Roffler-Tarlov SK (1998)

Cell death during development of testis and cerebellum in the mutant mouse weaver. *Dev Biol* 195: 174-186

Hartmann D, Ziegenhagen MW, Sievers J (1998)

Meningeal cells stimulate neuronal migration and the formation of radial glial fascicles from the cerebellar external granular layer. *Neurosci Lett* 244: 129-132

Hartmann D, Schulze M, Sievers J (1998)

Meningeal cells stimulate and direct the migration of cerebellar external granule cells in vitro. *J Neurocytol* 27: 395-409

Ito M (1982)

Experimental verification of „Marr-Albus“ plasticity assumption for the cerebellum. *Acta Biol* 33: 189-199

Ito M (2002)

The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3: 896-902

Ixart G, Siaud P, Barbanel G, Mekaouche M, Givalois L, Assenmacher I (1993)

Circadian variations in the amplitude of corticotropin-releasing hormone 41 (CRH41) episodic release measured in vivo in male rats: correlations with diurnal fluctuations in hypothalamic and median eminence CRH41 contents. *J Biol Rhythms* 8: 297-309

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: *Principles of neural science*. The University of Chicago Press, New York (2000) S. 832-851

King JS, Madtes P Jr, Bishop GA, Overbeck TL (1997)

The distribution of corticotropin-releasing factor (CRF), CRF binding sites and CRF1 receptor mRNA in the mouse cerebellum. *Progr Brain Res* 114: 55-66

King JS, Bishop GA (2002)

The distribution and cellular localization of CRF-R1 in the vermis of the postnatal mouse cerebellum. *Experimental Neurology* 178: 175-185

Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J (2000)

Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24: 415-419

Klinke R, Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1996) S. 460-470.

Komuro H, Rakic P (1998)

Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18: 478-490

Lacoboni M (2001)

Playing tennis with the cerebellum. *Nat Neurosci* 4: 555-556

Lafarga M, Andres MA, Calle E, Berciano MT (1998)

Reactive gliosis of immature Bergmann-Glia and microglial cell activation in response to cell death of granule cell precursors induced by methylazoxymethanol treatment in developing rat cerebellum. *Anat Embryol (Berl)* 198: 111-122

Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (2001)

Identification of urocortin 3, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7570-7575

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T (1995)

Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 92: 836-840

Maricich SM, Soha J, Trenkner E, Herrup K (1997)

Failed cell migration and death of purkinje cells and deep nuclear neurons in the weaver cerebellum. *J Neurosci* 17: 3675-3683

Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV (1982)

Immunocytochemical localisation of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat* 165: 385-396

Mezey E, Palkovits M (1991)

Time dependent changes in CRF and its mRNA in the neurons of the inferior olive following surgical transection of the olivocerebellar tract in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 10: 55-59

Miyata M, Okada D, Hashimoto K, Kano M, Ito M (1999)

Corticotropin-releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. *Neuron* 22: 763-775

Muller T, Kettenmann H (1995)

Physiology of Bergmann-Glial cells. *Int Rev Neurobiol* 38: 341-359

Nunes Cardozo B, Want J van der (1990)

Ultrastructural organization of the retin-preecto-olivary pathway in the rabbit: a combined WGA-HRP tracing and GABA immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 291: 313-327

Overbeck TL, King JS (1999)

Developmental expression of corticotropin-releasing factor in the postnatal murine cerebellum. *Brain Res Dev* 115: 145-159

Palay SL, Chan-Palay V: *Cerebellar Cortex. Cytology and Organization*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York (1974) S. 297-305

Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW (1993)

Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 133: 3058-3061

Phend KD, Rustioni A, Weinberg RJ (1995)

An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 43: 283-292

Pol AN van den, Gorcs T (1986)

Synaptic relationships between neurons containing vasopressin, gastrin-releasing peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus: dual ultrastructural immunocytochemistry with gold-substituted silver peroxidase. *J Comp Neurol* 252: 507-521

Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W (1994)

Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci* 91: 8777-8781

Powers RE, De Souza EB, Walker LC, Price DL, Vale WW, Young WSI (1987)

Corticotropin-releasing factor as a transmitter in the human olivocerebellar pathway. *Brain Res* 415: 347-352

Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR (1995)

Distribution of Bergmann-Glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36: 509-517

Reynolds ES (1963)

The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208

Riquelme R, Miralles CP, de Blas AL (2002)

Bergmann glia GABAA receptor concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci* 22: 10720-10730

Rossi F, Want JJL van der, Wiklund L, Strata P (1991)

Reinnervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres surviving a subtotal lesion of the inferior olive in the adult rat. II. Synaptic organization on reinnervated Purkinje cells. *J Comp Neurol* 308: 536-554

Stout SC, Owens MJ, Nemeroff CB (2002)

Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 1085-1092

Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S (1996)

Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron* 16: 587-599

Smith AM, Mullen RJ (1997)

Parallin, a cerebellar granule cell protein the expression of which is developmentally regulated by Purkinje cells: evidence from mutant mice. *Brain Res Dev* 104: 79-89

Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981)

Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci* 78: 6517-6521

Swinny JD, Kalicharan D, Gramsbergen A, van der Want JJ (2002)

The localisation of urocortin in the adult rat cerebellum: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 114: 891-903

Swinny JD, Kalicharan D, Blaauw EH, Ijkema-Paassen J, Shi F, Gramsbergen A, van der Want JJ (2003)a

Corticotropin releasing factor receptor types 1 and 2 are differentially expressed in pre- and postsynaptic elements in the postnatal developing rat cerebellum. *Eur J Neurosci.* 18: 549-562

Swinny JD, Metzger F, Ijkema-Paassen J, Gramsbergen A, van der Want JJ (2003)b

Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. submitted

Trepel: Neuroanatomie. Struktur und Funktion. Urban und Schwanzenberg, München-Wien-Baltimore (1995) S. 137-154

Vale W, Spiess J, River C, River J (1981)

Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394-1397

Valentino RJ, Rudoy C, Saunders A, Liu XB, Bockstaele EJ van (2001)
Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. *Neurosci* 106: 375-384

Wang VY, Zoghbi HY (2001)
Genetic regulation of cerebellar development. *Nature Rev* 2: 484-490

Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP (1998)
Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840: 21-32

Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y, Watanabe M (2000)
Dynamic transformation of Bergmann-Glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* 418: 106-120

Yamano M, Tohyama M (1994)
Distribution of corticotropin-releasing factor and calcitonin gene-related peptide in the developing mouse cerebellum. *Neurosci Res* 19: 387-396

Zhang L, Goldmann JE (1996)
Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol* 370: 536-550

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jirikowski für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die geduldige Betreuung der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Dr. van der Want und seinen Mitarbeitern danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung in Groningen, Niederlande. Eine große Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten waren Herr Kalicharan, Herr Blaauw und Herr Dr. Liem. Bei der digitalen Umsetzung danke ich besonders Herrn Hellinga für seine fast endlose geduldige Hilfe.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau de Wit und Frau Blom bedanken, die mich besonders emotional in diese Zeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Sharafbayani, geb. Bornmann
Vorname: Heidi
Geburtsdatum: 04.01.1977
Geburtsort: Jena
Adresse: Winkel 2
07747 Jena
E-Mail: heidibornmann@hotmail.com
Familienstand: verheiratet mit Burhan Sharafbayani (06.01.2003)

Ausbildung

1983 – 1991 Polytechnische Oberschule “Lobeda” in Jena
1991 – 1995 Albert-Schweitzer-Gymnasium in Jena
1995 Abitur
1995 – 1996 Biologiestudium an der Universität Potsdam
1996 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (FSU Jena)
1998 – 1999 Auslandsaufenthalt und –studium an der „Rijksuniversiteit“ Groningen (RUG), Niederlande
1998 – 1999 Stipendiatin im Erasmus-Programm
September 2000 Erstes Staatsexamen FSU Jena
September 2002 Zweites Staatsexamen FSU Jena
2002 – 2003 Praktisches Jahr im Akademischen Krankenhaus Groningen (AZG), Niederlande
Oktober 2003 Drittes Staatsexamen FSU Jena
November 2003 AiP (Arzt im Praktikum) in der Dermatologie im AZG

Jena, 14. Juni 2004 Heidi Sharafbayani

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Jirikowski, Dr. van der Want, Herr Kalicharan, Herr Blaauw sowie Herr Hellinga,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde und,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 14. Juni 2004

Heidi Sharafbayani